

**Untersuchungen zur funktionellen Relevanz der NBFs in SURs  
und den molekularen Determinanten der allosterischen  
Interaktion zwischen den Bindungsstellen für SUs und KCOs**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von

**Michael Beyer**

aus

**Ulm**

1. Referent:	Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. M. Schwanstecher
2. Referent:	Prof. Dr. med. Dr. hc. P. Illes
Eingereicht am:	23.09.2004
Mündliche Prüfung am:	13.12.2004
Druckjahr:	2004

## Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Tagungsbeiträge:

BEYER M, TAWAKKOL W, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Homology Modeling of the Nukleotide Binding Folds in SURs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363** (Suppl.), R 73: 280; 42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März **2001**.

BEYER M, TAWAKKOL W, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Homology Modeling of the Nukleoside Binding Folds in Sulfonylurea Receptors. *Diabetes und Stoffwechsel* **10** Suppl. 1: 4 - 15; 36. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Aachen, Mai **2001**.

BEYER M, TAWAKKOL W, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Tertiärstruktur der Nukleotidbindenden Regionen in SURs. *SPP1003 Struktur und Funktion ATP-sensitiver und einwärtsgerichteter Kaliumkanäle*. Wissenschaftstreffen 2001 von Schwerpunktprogrammen der DFG in Berlin, September **2001**.

BEYER M, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Functional symmetry in the nucleotide binding folds of SURs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365** (Suppl.), R 63: 240; 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März **2002**.

BEYER M, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Differential impact of homologous point mutations in the nucleotide binding folds of Sulfonylurea Receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367** (Suppl.), R 66: 252; 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März **2003**.

BEYER M, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M: Differential impact of homologous point mutations in the nucleotide binding folds of Sulfonylurea Receptors. *Diabetes und Stoffwechsel* **12** Suppl. 1: 1 - 1; 38. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Bremen, Mai **2003**.

BEYER M and SCHWANSTECHE M: Molecular determinants of the allosteric interaction between the drug receptor sites on K<sub>ATP</sub>-channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **369** (Suppl.), R 64: 255; 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz, März **2004**.

BEYER M and SCHWANSTECHE M: Molecular determinants of the allosteric interaction between the drug receptor sites on K<sub>ATP</sub>-channels. *Diabetes und Stoffwechsel* **13** Suppl. 1: P-117; 39. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft in Hannover, Mai **2004**.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2000 bis September 2004 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Frau Privatdozentin Dr. med. C. Schwanstecher und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. habil. M. Schwanstecher möchte ich für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser sehr interessanten Themenstellung und die Betreuung bei der Durchführung der Arbeit ganz herzlich danken. Mein besonderer Dank gilt auch Frau H. Fürstenberg, Frau C. Ott, Frau B. Pieper, Frau C. Rattunde und Frau P. Weber (Molekularbiologie und Zellkultur), sowie Frau V. Lier-Glaubitx und Frau S. Warmbold (Bindungsstudien) für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit, das angenehme Betriebsklima, ihre stete Diskussionsbereitschaft und den Spaß bei der Arbeit ebenfalls ausdrücklich danken.

*Für Barbara.*

*Ein Problem ist halb gelöst,  
wenn es nur klar formuliert ist.  
(John Dewey)*



<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Historie und Bedeutung des Hyperinsulinismus</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Inzidenz und Genetik des HI</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Assoziation des Hyperinsulinismus mit Defekten des K<sub>ATP</sub>-Kanals (HI-K<sub>ATP</sub>)</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Assoziation des Hyperinsulinismus mit Veränderungen des Metabolismus in der B-Zelle des Pankreas</b>	<b>4</b>
1.4.1 HI-GDH - Anormalitäten der Glutamat-Dehydrogenase und Hyperinsulinismus	4
1.4.2 HI-GK - Anormalitäten der Glucokinase und Hyperinsulinismus	5
1.4.3 HI-SCHAD - Anormalitäten der Kurzketten-L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Hyperinsulinismus	6
1.4.4 HI-EI - Hyperinsulinismus nach körperlicher Belastung (exercise-induced)	7
<b>1.5 Optionen zur Therapie des HI</b>	<b>7</b>
1.5.1 Glucagon zur Therapie des HI	8
1.5.2 Somatostatin und Analoga zur Therapie des HI	8
1.5.3 KCOs zur Therapie des HI	9
1.5.4 CKAs zur Therapie des HI	10
1.5.5 Pankreasteilresektion zur Therapie des HI	11
<b>1.6 ATP-sensitive Kalium-Kanäle</b>	<b>11</b>
<b>1.7 Die porenbildende Untereinheit des ATP-sensitiven Kalium-Kanals: K<sub>IR6.2</sub></b>	<b>12</b>
<b>1.8 Die regulatorische Untereinheit des ATP-sensitiven Kalium-Kanals: SURx</b>	<b>13</b>
1.8.1 Nachweis in Geweben	13
1.8.2 SURs sind ABC-Proteine	14
1.8.3 Bindungsstellen für SUs und KCOs in SURs	15

1.8.3.1	Lokalisation der Bindungsstelle für SUs	16
1.8.3.2	Lokalisation der Bindungsstelle für KCOs	17
1.8.3.3	Die Bindungsstellen für KCOs und SUs sind negativ-allosterisch aneinander gekoppelt	17
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Punktmutationen und chimäre Konstrukte</b>	<b>19</b>
3.1.1	Puffer und Lösungen	19
3.1.2	cDNA und Plasmide	20
3.1.3	Primer-Design	20
3.1.4	Punktmutationen (Site-directed Mutagenesis)	21
3.1.5	Kontrolle der PCR-Produkte	22
3.1.6	Chimäre Konstrukte	23
3.1.7	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	24
3.1.8	DNA-Ligation	25
<b>3.2</b>	<b>Transformation</b>	<b>25</b>
3.2.1	Lösungen und Medien	25
3.2.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	27
3.2.3	Durchführung einer Transformation	28
<b>3.3</b>	<b>Plasmidpräparation</b>	<b>28</b>
3.3.1	Präparation nach der „boiling“- oder STET-Methode	29
3.3.1.1	Puffer und Lösungen	29
3.3.1.2	Prinzip und Durchführung der „boiling“- oder STET-Methode	30
3.3.2	Säulenpräparation	31
3.3.2.1	Prinzip und Durchführung der Säulenpräparation	31



<b>3.4</b>	<b>DNA-Sequenzanalyse und Konservierung einer Bakterienkultur</b>	<b>32</b>
3.4.1	Durchführung der Sequenzierung	32
3.4.2	Untersuchung und Bearbeitung der Sequenzen	32
3.4.3	Kryokonservierung eines Bakterienklons	32
<b>3.5</b>	<b>Kultivierung und Konservierung von COS1-Zellen</b>	<b>33</b>
3.5.1	Lösungen und Medien	33
3.5.2	Kultivierung und Passagieren von COS1-Zellen	34
3.5.3	Konservierung von COS1-Zellen	35
<b>3.6</b>	<b>Transfektion</b>	<b>35</b>
3.6.1	Lösungen und Medien	35
3.6.2	Durchführung einer Transfektion (DEAE-Dextran-Methode)	37
3.6.3	Histologische LacZ - Färbung	37
3.6.3.1	Lösungen	38
3.6.3.2	Durchführung und Auswertung der LacZ - Färbung	39
<b>3.7</b>	<b>Membranpräparation</b>	<b>39</b>
3.7.1	Lösungen und Medien	39
3.7.2	Durchführung der Membranpräparation aus COS1-Zellen	40
<b>3.8</b>	<b>Bindungsexperimente an COS1-Membranen</b>	<b>41</b>
3.8.1	Puffer für Bindungsexperimente	41
3.8.2	Stammlösungen	41
3.8.3	Lösungen der Radioliganden	42
3.8.4	Vorbereitung der Membranen	43
3.8.5	Gleichgewichtsbindungsexperimente	43
3.8.5.1	Prinzip des Gleichgewichtsbindungsexperiments und Filtrationsassays	43
3.8.5.2	Durchführung der Bindungsstudien	44

<b>3.9</b>	<b>Datenbanksuche und Sequenzvergleich</b>	<b>45</b>
<b>3.10</b>	<b>Homologiemodell</b>	<b>46</b>
<b>3.11</b>	<b>Datenauswertung</b>	<b>46</b>
3.11.1	Statistik	46
3.11.2	Gleichgewichtsbindungen	47
3.11.3	Dissoziationskonstanten	47
3.11.4	Dissoziationskinetiken	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>3D-Struktur von NBF1 und NBF2 des SUR2A</b>	<b>49</b>
4.1.1	Einführung	49
4.1.2	Charakterisierung des Chimäre I <sub>Y1205A</sub>	50
4.1.3	3D-Modelling der NBFs von SUR2A	52
4.1.3.1	Sequenzvergleich der NBF des TAP1 und der NBFs des SUR2A	54
4.1.3.2	Tertiärstruktur der NBF1 und NBF2 des SUR2A	55
4.1.3.3	Strukturelle Symmetrie der NBF1 und NBF2 des SUR2A	56
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs des SUR2A</b>	<b>57</b>
4.2.1	Einführung	57
4.2.2	Bedeutung hochkonservierter Aminosäuren in der NBF2 des SUR2A	57
4.2.3	Substitution hochkonservierter Aminosäuren in der NBF2 des SUR2A	58
4.2.4	Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren in NBF1 des SUR2A	60
4.2.5	Stabilisierung des Nukleotid-Adeninrings	62
4.2.6	Substitution von Y1317 in NBF2	64
4.2.7	Substitution von F675 in NBF1	65
4.2.8	Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs des SUR führen nicht zu Änderungen der Affinitäten für SUs und KCOs	66

<b>4.3</b>	<b>HI-analoge Mutationen in den NBFs des SUR2A</b>	<b>69</b>
4.3.1	Substitution HI-analoger Aminosäuren in den NBFs des SUR2A	70
4.3.2	HI-analoge Mutationen in den NBFs des SUR führen nicht zu Änderungen der Affinitäten für SUs und KCOs	74
4.3.3	Lokalisierung HI-analoger Mutationen in den NBFs des SUR2A	76
<b>4.4</b>	<b>Molekulare Determinanten der allosterischen Interaktion zwischen den Bindungsstellen für SUs und KCOs</b>	<b>78</b>
4.4.1	Einführung	78
4.4.2	Negativ-allosterische Kopplung der Bindungsstellen für SUs und KCOs wird über den C-Terminus und die SUBR vermittelt	79
4.4.2.1	Der C-Terminus des SUR ist kritisch für die allosterische Interaktion	79
4.4.2.2	Rolle von TMD0, TMDI und NBF1 für die Kopplung der sites	82
4.4.2.3	Rolle von KCOI, KCOII, TMR12 und TMR13 sowie NBF2 für die Kopplung der sites	82
4.4.2.4	Die SUBR ist kritisch für die Kopplung der sites	84
4.4.3	Eine Aminosäure der SUBR des SUR beeinflusst die negativ-allosterische Kopplung der hochaffinen Bindungsstellen	85
4.4.3.1	Verdrängung von [ <sup>3</sup> H]Glibenclamid durch Pinacidil an Chimäre X mit Punktmutationen in der SUBR	86
4.4.3.2	Verdrängung von [ <sup>3</sup> H]P1075 durch Glibenclamid an Chimäre X mit Punktmutationen in der SUBR	87
4.4.3.3	Die Affinitäten für SUs und KCOs werden durch die Substitution C1175F in Chimäre X nicht beeinflusst	88
4.4.3.4	Unterschiedliche Substituenten in Position 1175 modulieren die allosterische Interaktion der sites	90
4.4.3.5	Die durch Glibenclamid induzierte Zunahme der Bindung von [ <sup>3</sup> H]P1075 ist nicht auf einen Anstieg der Affinität zurückzuführen	92
4.4.3.6	Einfluss der Glibenclamid-Konzentration auf die Bindung von [ <sup>3</sup> H]P1075 an Chimäre X-C1175K	93
4.4.3.7	Einfluss von Glibenclamid auf die Kinetik der Dissoziation des Komplexes zwischen Chimäre X-C1175K und [ <sup>3</sup> H]P1075	94

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Rolle der NBFs ins SURs</b>	<b>96</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Tertiärstrukturen der NBFs des SUR2A und des TAP1 sind weitgehend identisch</b>	<b>97</b>
<b>5.3</b>	<b>Strukturelle Symmetrie der NBFs in SURs</b>	<b>98</b>
<b>5.4</b>	<b>Funktionelle Symmetrie der NBFs in SURs</b>	<b>98</b>
5.4.1	Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren	98
5.4.2	Modulation der Stabilisierung des Nukleotid-Adeninrings	100
5.4.3	HI-analoge Mutationen	101
5.4.4	NBF1 fungiert als Hauptdeterminationsfaktor für den Konformationswechsel des SUR	102
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs</b>	<b>105</b>
5.5.1	Die Bindungsstellen sind separat und strikt negativ-allosterisch gekoppelt	105
5.5.2	Weite Bereiche des SUR besitzen keine Bedeutung für die Interaktion der sites	105
5.5.3	Die SUBR ist kritisch für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen	106
5.5.4	Modell der Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs	107
5.5.5	Identifizierung von Aminosäuren mit kritischer Bedeutung für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen	108
5.5.5.1	Eine Aminosäure in der SUBR besitzt Schlüsselfunktion	108
5.5.5.2	Variation der allosterischen Interaktion durch differente Substitutionen in Position 1175	109
5.5.6	Der SUR besitzt vermutlich eine weitere Bindungsstelle für SUs mit niedriger Affinität	110
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>117</b>

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

Abb.	Abbildung
ABC-Protein	ATP binding cassette protein, ATP-bindendes Kassettenprotein
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
B <sub>max</sub>	Anzahl der Bindungsstellen
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie, 1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq
CKA	Calcium-Kanal-Antagonist
COS	CV1, Origin of SV40
ct	C-Terminus
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
DEAE	Diethylaminoethanol
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	disintegration per minute; Zerfall pro Minute
E. coli XL1 Blue	Episurian coli XL1 Blue supercompetent cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EC <sub>50</sub>	halbmaximal wirksame Substanzkonzentration
Fa.	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gravitationsbeschleunigung ( $9,81 \text{ m/s}^2$ )
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
GK	Glucokinase
<sup>3</sup> H	Tritium (Isotop des Wasserstoffs)
ham	Hamster
hum	human
HBSS	HEPES buffered saline solution
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HI	hyperinsulinism in infancy; Hyperinsulinismus des Kleinkindes
IC <sub>50</sub>	halbmaximal inhibitorische Substanzkonzentration
K <sub>ATP</sub> -Kanal	ATP-sensitiver Kalium-Kanal
kb	Kilobasen; entsprechend 1000 Basen

KCO	K <sup>+</sup> channel opener (Kalium-Kanal-Öffner)
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>IR</sub>	einwärtsgerichteter Kalium-Kanal
LB	Luria-Bertani-Medium
mA	Milliampere
min	Minuten
mV	Millivolt
n	Hill-Koeffizient (Steigungskoeffizient)
N	Anzahl der Einzelexperimente
n.d.	nicht detektierbar
NBF	nucleotide binding fold (Nukleotid-bindende Region)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphat
p	Niveau des $\alpha$ -Fehlers
P1075	N-Cyano-N'-(1,1-dimethylpropyl)-N''-3-pyridylguanidin
p.a.	pro analysi
PBS	phosphate buffered saline; Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pos.	Position
rat	Ratte
s	Sekunde
s./ s.a./ s.o./ s.u.	siehe/ siehe auch/ siehe oben/ siehe unten
SCHAD	Short-chain L-3-hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase; Kurzketten-L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
SU	sulfonylurea, Sulfonylharnstoff
SUR	sulfonylurea receptor; Sulfonylharnstoffrezeptor
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Antigen Peptid Transporter
TBS	Tris buffered saline
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMD	Transmembranäre Domäne
TMR	Transmembranäre Region
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid

# **1 Einleitung**

## **1.1 Historie und Bedeutung des Hyperinsulinismus**

Hyperinsulinismus wurde erstmals im Jahre 1938 von LAIDLAW beschrieben, der eine Neu-Differenzierung pankreatischer Inselzellen mit dem Begriff der Nesidioblastose belegte (LAIDLAW, 1938). Diese Erkrankung führt zu einer von der metabolischen Kontrolle der Glucosekonzentration entkoppelt gesteigerten Insulinsekretion und fördert damit massiv die Aufnahme von Glucose in Muskel- und Fettzellen, stimuliert die Glycolyse, die Glycogensynthese und hemmt sowohl die Glycogenolyse als auch die Gluconeogenese (THOMAS et al., 1995 und 1996; NICHOLS et al., 1996; NESTOROWICZ et al., 1996 und 1998; AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999; DE LONLAY-DEBENEY et al., 1999; OTONKOSKI et al., 1999; GLASER et al., 1999; SHARMA et al., 1999 und 2000; FOURNET et al., 2001; FOURNET und JUNIEN, 2003; REIMANN et al., 2003). Chronisch rezidivierende Hypoglykämien mit Plasmakonzentrationen an Glucose unter 50 mg / dl sind Ursache für frühe Komplikationen des HI, die mit Entwicklungsverzögerung, geistiger Retardierung und neurologischer Dysfunktion einhergehen (KALHAN et al, 1977; LEIBOWITZ et al., 1995; MEISSNER et al., 1997; AYNLEY-GREEN et al., 2000; MENNI et al., 2001; TYRRELL et al., 2001; STANLEY, 2002). Unbehandelt ist diese Stoffwechselentgleisung in vielen Fällen schon während der ersten postnatalen Monate nicht mit dem Leben vereinbar (als Übersichtsartikel siehe: DUNNE et al., 2004).

Der Begriff der Nesidioblastose wurde bis heute durch zahlreiche Synonyme wie PHHI (persistent hyperinsulinaemic hypoglycemia of infancy; Persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kleinkindalters), NHI (neonatal hyperinsulinism; frühkindlicher Hyperinsulinismus), CHI (congenital hyperinsulinism in infancy; Kongenitaler Hyperinsulinismus des Kleinkindes) und HI (hyperinsulinism in infancy; Hyperinsulinismus des Kleinkindes) erweitert und konkretisiert (Online Mendelian Inheritance in Man: OMIM 256450).

## **1.2 Inzidenz und Genetik des HI**

Die Inzidenz der multifaktoriellen Erkrankung reicht in der Allgemeinbevölkerung von ca. 1 zu 20.000 Geburten in Kuwait (RAMADAN et al., 1999) über 1 zu 27.000 in Irland (GLASER et al., 2000) bis zu 1 zu 40.000 bzw. 1 zu 50.000 in Finnland und den Niederlanden (OTONKOSKI et al., 1999). In einigen isolierten Gegenden jedoch kann die Erkrankung durch einen eingegrenzten genetischen Pool deutlich häufiger auftreten. So beträgt die Erkrankungshäufigkeit z.B. im zentralen Finnland und im Gebiet der arabischen Halbinsel 1 zu 3.200 bzw. 1 zu

2.500. Generell ist die männliche Bevölkerungsgruppe im Vergleich zur weiblichen mit einem Verhältnis von 1,2 zu 1 (für die fokale Form des HI; s.u.) bis 1,8 zu 1 (für die diffuse Form des HI; s.u.) signifikant häufiger betroffen (GLASER et al., 2000).

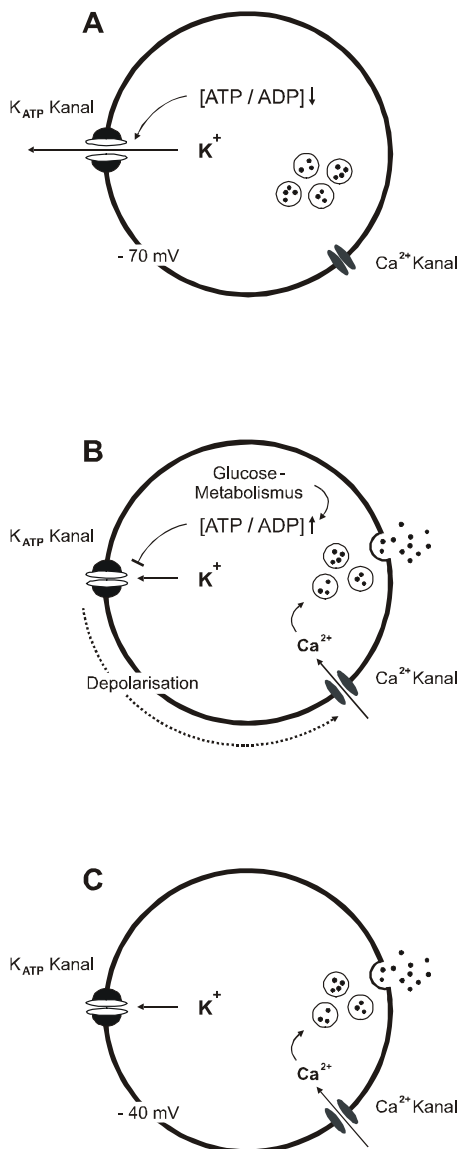
Das Syndrom des HI entspricht einer klinisch wie genetisch als auch funktionell sehr heterogenen Erkrankung. Morphologisch sind zwei Subtypen der autosomal rezessiven Erkrankung mit konstitutiv gesteigerter Insulinsekretion zu unterscheiden. Während diffuse Anormalitäten (DiHI) der B-Zelle des Pankreas mit Defekten unterschiedlicher Genloci assoziiert sind: Ch.11p15, 7p15-p13, 10q23.3 und 4q22-q26, zeigt die fokale adenomatöse Hyperplasie (FoHI) eine singuläre Beziehung mit Anormalitäten im kurzen Arm des Chromosoms 11 (Ch.11p15) - einem Bereich, der für den Sulfonylharnstoffrezeptor SUR1 (ABCC8) und die Kalium-Kanal bildende Pore  $K_{IR6.2}$  (KCNJ11) des ATP-sensitiven Kaliumkanals ( $K_{ATP}$ -Kanal) kodiert. Jeweils vier Untereinheiten des SUR1, die zur Familie der ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC-Transporter) gehören, und vier porenbildende  $K_{IR6.2}$ -Untereinheiten rekonstituieren den  $K_{ATP}$ -Kanal der B-Zelle des Pankreas (s.a. 1.6 bis 1.8).

### **1.3 Assoziation des Hyperinsulinismus mit Defekten des $K_{ATP}$ -Kanals (HI- $K_{ATP}$ )**

Studien aus Frankreich, Israel und den USA ergaben, dass ca. 40 - 65 % aller HI-Patienten eine Form der Hyperinsulinämie zeigen, die mit Defekten des  $K_{ATP}$ -Kanals SUR1/ $K_{IR6.2}$  assoziiert ist (AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999; DE LONLAY-DEBENEY et al., 1999; GLASER et al., 1999 und 2000; STANLEY, 2002). Annähernd 100 HI-Mutationen in SUR1 und  $K_{IR6.2}$  sind bislang bekannt - über 80 % davon finden sich im SUR (FOURNET und JUNIEN, 2003).  $K_{ATP}$ -Kanäle der pankreatischen B-Zelle bestimmen über ihre Offenwahrscheinlichkeit maßgeblich das Ruhemembranpotential und fungieren als regulatorische Einheit zwischen Glucose-induzierten metabolischen Änderungen und der elektrischen Aktivität der B-Zelle (COOK et al., 1988; MISLER et al., 1992; KOSTER et al., 2000; SEINO et al., 2000). Während in der ruhenden Zelle bei nicht-stimulatorischer Glucose-Konzentration von 3 mM etwa 6 - 8 % der  $K_{ATP}$ -Kanäle geöffnet sind, wird bei hyperglykämischer Situation (6 mM Glucose) der Anteil offener Kanäle auf unter 2 - 3 % reduziert, wodurch das Schwellenpotential zur Aktivierung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle erreicht wird (COOK et al., 1988; SCHWANSTECHEER et al., 1992a). Ein resultierender Anstieg der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration induziert die Freisetzung von Insulin (HENQUIN, 1987; Abb. 1). Die Substrat-induzierte Hemmung des  $K_{ATP}$ -Kanals beruht vermutlich letztlich auf der Abnahme der Konzentration von cytosolischem ADP bei gleichzeitiger Zunahme der Konzentration von ATP.



Defekte im  $K_{ATP}$ -Kanal der B-Zelle (Substitutionen, Insertionen oder Deletionen in SUR1 und  $K_{IR6.2}$ ) sind nach Insulinomen die häufigste bekannte Ursache für HI (DUNNE et al., 2004). Für einige der Mutationen wurde gezeigt, dass sie zu Reduktion oder Verlust der Proteinexpression, fehlerhafter Protein-Faltung einer der Untereinheiten des Kanals oder zu einer veränderten strukturellen Zusammensetzung des  $K_{ATP}$ -Kanals führen. Zelluläre Transportdefekte, Dysfunktion der Regulation durch Nukleotide und dadurch bedingte veränderte Offenwahrscheinlichkeit des ATP-sensitiven Kalium-Kanals sind weitere Ursachen für die Entstehung des HI. Für eine Vielzahl der Gendefekte in ABCC8 (SUR1) und KCNJ11 ( $K_{IR6.2}$ ), die mit HI assoziiert sind, blieb die molekulare Ursache für die Störung der Kanalfunktion bislang jedoch ungeklärt (NESTOROWICZ et al., 1998; FOURNET et al., 2001; FOURNET und JUNIEN, 2003).



**Abb. 1** Kontrolle der Insulinsekretion pankreatischer B-Zellen - physiologische Situation und Zustand bei HI- $K_{ATP}$  (Abb. nach SHEPHERD et al., 2000). **A, B** Ein Anstieg des Verhältnisses der cytosolischen Konzentrationen von ATP und ADP führt durch Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit des  $K_{ATP}$ -Kanals zu Depolarisation des Potentials der Plasmamembran, das in Ruhe etwa -70 mV beträgt und zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Eine Erhöhung der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration geht mit Induktion der Insulinsekretion einher (SCHWANSTECHEER et al., 1994). Das  $[ATP]/[ADP]$ -Verhältnis steigt mit der Plasmakonzentration an Glucose bzw. mit dem intrazellulären Glucosemetabolismus. **C** Zahlreiche HI-Mutationen in SUR1 und  $K_{IR6.2}$  führen zu einer von der Glucosekonzentration entkoppelt gesteigerten Insulinsekretion. Einige der Mutationen induzieren einen vollständigen Verlust der  $K_{ATP}$ -Kanal-Aktivität, andere erzeugen eine reduzierte Empfindlichkeit gegenüber physiologischen  $K_{ATP}$ -Kanal-Öffnern wie z.B. MgADP (NICHOLS et al., 1996). Eine Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit von  $K_{ATP}$ -Kanälen auch in Abwesenheit einer stimulatorischen Glucosekonzentration führt zu dauerhafter Membrandepolarisation auf ca. -40 mV, gefolgt von verstärktem  $Ca^{2+}$ -Einstrom und dereguliert gesteigerter Insulinsekretion (AYNSLEY-GREEN et al., 2000).

## **1.4 Assoziation des Hyperinsulinismus mit Veränderungen des Metabolismus in der B-Zelle des Pankreas**

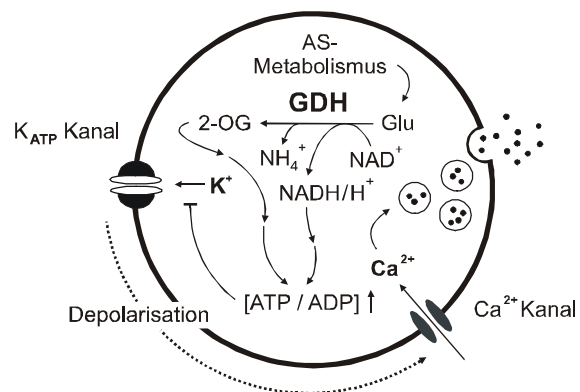
Andere Formen des HI präsentieren im Vergleich zu HI-K<sub>ATP</sub> eine deutlich mildere Symptomatik. Diese ist auf metabolische Änderungen der pankreatischen B-Zelle zurückzuführen. Hyperinsulinämisch induzierte Hypoglykämien sind deutlich seltener und oftmals nur postprandial apparent. Im Gegensatz zur kongenitalen Hyperinsulinämie des Kleinkindalters können hypoglykämische Episoden dieser HI-Formen erstmalig auch im späteren Kindes- bzw. Erwachsenenalter auftreten. In diesen Fällen ist die Erkrankung nicht mit Anormalitäten in den Genen ABCC8 und KCNJ11 assoziiert. Bisher wurden HI-Mutationen in drei weiteren Genen beschrieben: 10q23.3 (Glutamat-Dehydrogenase), 7p15-p13 (Glucokinase) und 4q22-q26 (3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase) - jedes davon ist an der Glucose-Homöostase beteiligt (GLASER et al., 1998; STANLEY et al., 1998; SERVICE et al., 1999). Davon abzugrenzen ist eine weitere Form des Hyperinsulinismus, die nach moderater körperlicher Belastung zu Tage tritt (exercise-induced hypoglycaemic hyperinsulinism; MEISSNER et al., 2001; OTONKOSKI et al., 2003).

### **1.4.1 HI-GDH - Anormalitäten der Glutamat-Dehydrogenase und Hyperinsulinismus**

Die Glutamat-Dehydrogenase (GDH) katalysiert durch oxidative Desaminierung die Umwandlung von Glutamat zu 2-Oxo-Glutarat (2-OG). Dabei wird Ammoniak bzw. ein Ammonium-Ion freigesetzt und die Reduktionsäquivalente werden auf das Coenzym NAD<sup>+</sup> übertragen. GDH bildet somit ein koppelndes Glied des Aminosäure-Metabolismus zum ATP-Haushalt der Zelle, da sowohl 2-Oxo-Glutarat, das anaplerotisch den Citrat-Zyklus speist, als auch NADH/H<sup>+</sup> durch oxidative Phosphorylierung zur ATP-Bildung beiträgt (Abb. 2). Während die Aktivität der GDH durch Leucin und ADP verstärkt wird, agiert GTP als allosterischer Inhibitor. Zahlreiche Mutationen in GLUD1 - dem Gen der GDH - führen zu einer Aktivitätserhöhung des Enzyms, z.B. durch Defekte in der GTP-bindenden Domäne des GDH (MACMULLEN et al., 2001; FANG et al., 2002). Die verstärkte Aktivität resultiert in erhöhter Produktion von 2-Oxo-Glutarat und NH<sub>4</sub><sup>+</sup> bei gleichzeitiger Reduktion der Glutamat-Konzentration. Da Glutamat als essentielles Substrat für die Bildung von N-Acetyl-Glutamat (NAG) – einem allosterischen Stimulus des hepatischen Harnstoff-Zyklus – fungiert, resultiert eine Inhibierung des Harnstoff-Zyklus, was zu erhöhten Ammoniak-Spiegeln im Blut führt. NAG reguliert die erste Reaktion des Zyklus: Die Bildung von Carbamoylphosphat aus HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>

und  $\text{NH}_4^+$ . Nachfolgende Reaktionen führen letztlich zur Synthese von Harnstoff. Patienten mit aktivitätserhöhenden Mutationen der mitochondrialen GDH (HI-GDH) zeigen zusätzlich zur Hyperinsulinämie bis zu drei- bis fünffach erhöhte Plasmakonzentrationen an  $\text{NH}_4^+$  (STANLEY et al., 1998), weshalb diese Form des HI auch als hyperinsulinämisch-hyperammoniakalisches Syndrom bezeichnet wird (KELLY und STANLEY, 2001).

**Abb. 2** Mutationen in der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) sind mit HI assoziiert. Die GDH katalysiert die Desaminierung des aus dem Aminosäure (AS) - Metabolismus entstehenden Glutamats (Glu) zu 2-Oxo-Glutarat (2-OG). Coenzym dieser Reaktion ist  $\text{NAD}^+$ , das zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert wird. Sowohl 2-OG, das den Citrat-Zyklus speist, als auch  $\text{NADH}/\text{H}^+$ , das oxidativ phosphoryliert wird, führt über einen Anstieg des Verhältnisses der cytosolischen Konzentrationen von ATP zu ADP zu Reduktion der Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals und Depolarisation der Plasmamembran. Folge ist eine Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, ein Anstieg der cytosolischen Konzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  und Induktion der Insulinsekretion (siehe auch Abb. 1 B). Aktivitätserhöhende Mutationen (MACMULLEN et al., 2001; FANG et al., 2002) der GDH induzieren über inadäquate Steigerung des ATP/ADP-Verhältnisses eine hyperinsulinämische Hypoglykämie.



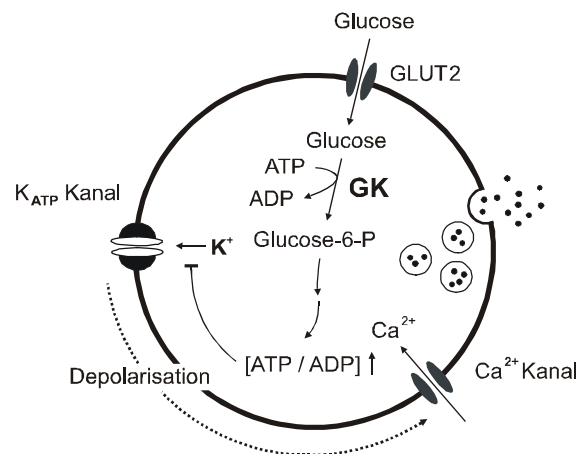
#### 1.4.2 HI-GK - Anormalitäten der Glucokinase und Hyperinsulinismus

Glucose wird durch einen insulinunabhängigen Transporter GLUT2 in die pankreatische B-Zelle befördert. Dort katalysiert die Glucokinase (GK) als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym die Initialreaktion der Glycolyse: Die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat unter Umsetzung von ATP zu ADP. Weiterführende Reaktionen münden in der Bildung von ATP und Pyruvat bzw. über oxidative Decarboxylierung in Acetyl-CoA, das über den Citratzyklus maßgeblich zur ATP-Bildung beiträgt (Abb. 3). Durch Anhebung des cytosolischen Verhältnisses von ATP zu ADP wird die Insulinsekretion stimuliert. Zahlreiche Mutationen der GK, die zu einer Reduktion der Aktivität des Enzyms führen, konnten mit Hyperglykämien und Diabetes mellitus Typ II assoziiert werden (PILKIS et al., 1994; VELHO et al., 1997). Eine Reduktion der GK-Aktivität, die den Fluss der Glycolyse mindert, erniedrigt das ATP / ADP-Verhältnis und erhöht dadurch die  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal-Aktivität. Folge ist eine

Hyperpolarisation der Plasmamembran pankreatischer B-Zellen und Reduktion der Insulinsekretion.

Andererseits konnten Mutationen der GK z.B. V408M, V455M (GLASER et al., 1998) und A456V (CHRISTESEN et al., 2002) bei HI-Patienten detektiert werden (HI-GK), die eine deutlich erhöhte Affinität der GK zu Glucose zur Folge haben. Eine Steigerung der Glycolyse-Aktivität induziert in Bezug auf die Glucose-Konzentration erhöhte ATP-Spiegel, die mit reduzierter Offenwahrscheinlichkeit ATP-sensitiver Kalium-Kanäle und Hyperinsulinämien einhergehen.

**Abb. 3** Mutationen in der Glucokinase (GK) sind mit HI assoziiert. Die Glucokinase katalysiert die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P). ATP wird dabei zu ADP umgesetzt. Die Initialreaktion der Glycolyse fungiert als geschwindigkeitsbegrenzender Faktor, da die Aktivität der GK mit der Glucose-Konzentration variiert. Nachfolgende Reaktionen erhöhen das ATP / ADP-Verhältnis und induzieren letztlich die Insulinsekretion. Aktivitätssteigernde Mutationen (GLASER et al., 1998; CHRISTESEN et al., 2002) der GK führen zu einer von der metabolischen Kontrolle der Glucosekonzentration entkoppelt gestiegenen Insulinsekretion (HI-GK).



### 1.4.3 HI-SCHAD - Anormalitäten der Kurzketten-L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und Hyperinsulinismus

Freie Fettsäuren sind durch  $\beta$ -Oxidation von Acyl-CoA-Einheiten die Hauptenergiequelle unstimulierter B-Zellen des Pankreas (PRENTKI et al., 1997; DEENEY et al., 2000). Ein wesentlicher Schritt dieser mitochondrialen Energiegewinnung ist die sukzessive Abspaltung von Acetyl-CoA-Einheiten, die im Citrat-Zyklus und der Atmungskette weiter metabolisiert werden und zur ATP-Gewinnung der Zelle beitragen. Ein Teilschritt des oxidativen Reaktionszyklus ist die  $\text{NAD}^+$ -abhängige Oxidation  $\beta$ -ständiger Hydroxyl-Gruppen aktivierter 3-Hydroxy-Acyl-Einheiten zur Carbonylfunktion durch die L-3-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydro-

genase. Seltene Mutationen wie z.B. die Substitution C773T eines Subtyps der Dehydrogenase, der sog. Kurzketten-L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (Short-chain-L-3-hydroxy-acyl-CoA-dehydrogenase; SCHAD), führen zu reduzierter Aktivität des Enzyms (BENNETT et al., 1996). Ein resultierender Anstieg der Konzentrationen an langkettigen Acyl-CoA-Resten, L-3-Hydroxy-butyryl-CoA und dadurch bedingte Blockade des Carnitin-Carrier-Systems (durch Inhibierung der Carnitin-O-Palmitoyl-transferase) bzw. Einfluss der Metaboliten auf die Exocytose des Insulins sind mögliche Erklärungen für die Hyperinsulinämie durch Gendefekte in SCHAD (CLAYTON et al., 2001).

#### **1.4.4 HI-EI - Hyperinsulinismus nach körperlicher Belastung (exercise-induced)**

Seltene Fälle von HI wurden auch bei Patienten nach körperlicher Belastung beobachtet (exercise-induced hyperinsulinism, HI-EI). Trotz Normwerten von Nüchtern- und Glucose-induzierter Insulinsekretion, zeigten die Patienten milden Hyperinsulinismus nach moderater körperlicher Betätigung bzw. eine stark erhöhte Insulinsekretion mit symptomatischer Hypoglykämie nach anaerober sportlicher Belastung (MEISSNER et al., 2001). Diese Beobachtungen wurden von OTONKOSKI und Mitarbeitern mit einer erhöhten Sensitivität der B-Zelle auf anaerobe muskuläre Metaboliten wie Pyruvat und Lactat bzw. mit Anomalitäten des Pyruvat-Transportes oder -Metabolismus in Insulin-produzierenden Zellen assoziiert (OTONKOSKI et al., 2003).

### **1.5 Optionen zur Therapie des HI**

Die Art der Therapiemaßnahmen richtet sich zum einen nach dem Schweregrad des Hyperinsulinismus bzw. der Hypoglykämie, zum anderen ist die Kenntnis über die HI-Form und des zugrundeliegenden Defekts essentiell für den therapeutischen Erfolg. Als Folge der durch den erhöhten Insulinspiegel gehemmten Lipolyse werden hyperinsulinämische Hypoglykämien zusätzlich von einer Hypoketonämie begleitet. Dem Gehirn fehlt also sowohl das Primärsubstrat Glucose, als auch Ketonkörper als alternative Energiequelle (KALHAN et al., 1977). Erstes Behandlungsziel des neonatalen HI ist daher die Vermeidung bleibender neurologischer Schäden durch rasche und sichere Beseitigung von Hypoglykämien mit Stabilisierung des Blutzuckerspiegels bei mindestens 45 mg / dl ( $> 2,5 \text{ mmol / l}$ ; KANE et al., 1997). Eine Sofortmaßnahme ist die intravenöse Infusion von Glucose bis zu ca. 20 mg / kg / min und orale Gaben von Glucosepolymeren (z.B. Maltodextrinen) per Magensonde. Die alleinige Zufuhr von Kohlenhydraten jedoch ist unzureichend, um längerfristig eine

Normoglykämie zu erreichen, nicht zuletzt daher, weil die B-Zelle ihre Insulinsekretion Glucose-gesteuert reguliert und somit Glucose-induzierte hypoglykämische Vorfälle provoziert werden können (STRAUB et al., 2001). Weitere Therapiemöglichkeiten sind der Einsatz von Glucagon, Somatostatin bzw. analoger Verbindungen, KCOs wie z.B. Diazoxid und Analoga, Calcium-Kanal-Öffner wie z.B. Nifedipin und chirurgische Maßnahmen mit partieller oder subtotaler Resektion des Pankreas (AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999).

### **1.5.1 Glucagon zur Therapie des HI**

Das endogene Peptid Glucagon aus der A-Zelle des Pankreas induziert die Mobilisierung von freien Fettsäuren und Glucose durch Stimulation Glucagon-sensitiver Lipasen bzw. Inaktivierung der Glycogensynthese bei gleichzeitiger Steigerung der Glycogenolyse und Gluconeogenese. Bei intramuskulärer Applikation oder intravenöser Infusion des Hormons zwischen 5 und 10  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{Stunde}$  können hepatische Glycogenreserven rasch mobilisiert werden. Da Glucagon jedoch ein potentes Sekretagog für Insulin darstellt, folgt einem initialen Anstieg der Plasmakonzentration an Glucose eine sekundäre Hyperinsulinämie, die in erneuter Hypoglykämie münden kann (AYNSLEY-GREEN et al., 2000). Aus diesem Grund ist der Einsatz des Peptids zur Regulation der Glucosekonzentration neben der Indikation als rasch wirksames Notfallmedikament v.a. in Verbindung mit Inhibitoren der Insulinsekretion sinnvoll.

### **1.5.2 Somatostatin und Analoga zur Therapie des HI**

Somatostatin und das synthetische Analogon Octreotid mit höherer Aktivität und längerer Halbwertszeit sind potente und häufig verwendete Therapeutika zur Normalisierung des Blutzuckerspiegels. Diese Pharmaka, die entweder intramuskulär oder intravenös als Bolus bzw. in einer kontinuierlichen Infusion in einer Dosierung von 1 bis 10  $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{Tag}$  verabreicht werden, können sowohl in der Kurzzeit- als auch Langzeittherapie zum Einsatz kommen. Somatostatin und Analoga reduzieren die Insulinsekretion durch multifaktorielle Beeinflussung der B-Zell-Funktion (NILSSON et al., 1989). Vermutlich werden diverse  $\text{K}^+$ -Kanäle aktiviert ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -, G-Protein-gekoppelte einwärts gleichrichtende (inward rectifiers), verzögert aktivierende (delayed rectifiers),  $\text{Ca}^{2+}$ - und spannungsabhängige Kalium-Kanäle), was zu Somatostatin-induzierter Hyperpolarisation der Plasmamembran und somit zu Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und Abnahme der Insulinsekretion führt (siehe auch Abb. 1 B).

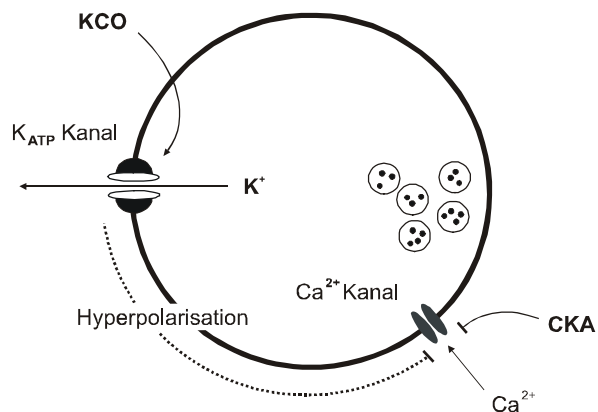
Darüber hinaus werden spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle direkt und unabhängig vom Membranpotential bzw. Mechanismen distal des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und Exocytose-Ereignisse beeinflusst (ULLRICH et al., 1990; HSU et al., 1991; MALM et al., 1993; RIBALET und EDDLESTONE, 1995; SMITH et al., 2001).

Die Vielzahl der Angriffspunkte lässt sich einerseits mit den zahlreichen Subtypen des Somatostatin-Rezeptors (SSTR) SSTR1-5 und Splice-Varianten begründen, andererseits sind die molekularen Mechanismen der elektrophysiologischen Ereignisse bis heute noch nicht vollständig geklärt (BRUNO et al., 1992; PATEL et al., 1994). Durch die Expression der SSTRs in unterschiedlichen Geweben ergeben sich vielfältige unerwünschte Wirkungen wie z.B. die Suppression der endokrinen Sekretion verschiedener Hormone.

### 1.5.3 KCOs zur Therapie des HI

Während Sulfonylharnstoffe (SUs) die Insulinfreisetzung aus der B-Zelle durch Hemmung der Offenwahrscheinlichkeit ATP-sensitiver Kaliumkanäle, gefolgt von Depolarisation der Plasmamembran und  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom induzieren (DEAN und MATTHEWS, 1968; MATTHEWS, 1985; HENQUIN, 1987), aktivieren Kalium-Kanal-Öffner (KCOs)  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle, erhöhen den  $\text{K}^{+}$ -Efflux und erzeugen damit eine Hyperpolarisation der Membran. Die resultierende verringerte Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und eine Reduktion der elektrischen Aktivität münden in einer Hemmung der pankreatischen Insulinsekretion (COOK und QUAST, 1990; EDWARDS und WESTON, 1995; Abb. 4).

**Abb. 4** KCOs und CKAs unterdrücken die Insulinsekretion. KCOs wie Diazoxid erhöhen die Offenwahrscheinlichkeit des  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanals und steigern den  $\text{K}^{+}$ -Efflux. Folge ist eine Hyperpolarisation des Membranpotentials und verminderte Aktivierung spannungsabhängiger L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Diese können auch direkt durch Calcium-Kanal-Antagonisten (CKAs) wie Nifedipin blockiert werden. Die daraus folgende reduzierte cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration vermindert die Insulinsekretion (für weitere Details: siehe 1.5.3 und 1.5.4).



Schon Anfang der 60er Jahre wurde die hyperglykämische Wirkung des synthetischen KCOs Diazoxid erkannt (DOLLEROY et al., 1962), die mit einer Hemmung der Insulinsekretion in den B-Zellen des Pankreas einhergeht (LEVIN et al., 1975). In oraler Applikationsform stellt Diazoxid in einer Dosierung zwischen 5 und 20 mg / kg / Tag bis heute ein wichtiges Behandlungsprinzip zur Therapie der hyperinsulinämischen Hypoglykämie dar (GRANT et al., 1986; DE LONLAY et al., 2002). In der für die Reduktion der Insulinsekretion wirksamen Dosis werden jedoch ebenfalls ATP-sensitive Kalium-Kanäle im Herzen und insbesondere im vaskulären System aktiviert. Hieraus ergibt sich eine Reihe von unerwünschten Wirkungen wie z.B. eine Verkürzung der kardialen Aktionspotentialdauer und damit Erhöhung des arrhythmogenen Potentials bzw. die Dilatation der glatten Muskulatur arterieller Blutgefäße und darausfolgender Tendenz zur Hypotonie (STANDEN et al., 1989). Weitere Nebenwirkungen, die den Einsatz von Diazoxid zur Therapie der Hypoglykämie limitieren, sind die Retention von  $\text{Na}^+$  und Wasser, Hyperurikämie, Thrombocytopenie, Leukopenie und eine erhöhte Infektionsanfälligkeit durch Reduktion des Serum-Levels an Immunglobulin G (TOUATI et al., 1998; AYNLEY-GREEN et al., 2000; DE LONLAY et al., 2002).

Strukturelle Weiterentwicklungen des Diazoxids führten zu einigen bisher nur experimentell zugelassenen Analoga wie z.B. BPDZ 44 (3-Alkylamino-4H-Pyrido[4,3-e]-1,2,4-Thiadiazin-1,1-Dioxid; KHELILI et al., 1999), BPDZ 73 (3-Alkylamino-4H-1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-Dioxid; BOVERIE et al., 2001) und BPDZ 154 (6,7-Dichloro-3-Isopropylamino-4H-1,2,4-Benzothiadiazin-1,1-Dioxid; COSGROVE et al., 2002). Diese Verbindungen zeigen bei gleichzeitiger Reduktion der unerwünschten Arzneimittelwirkungen eine erhöhte Potenz zur Unterdrückung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion und weisen eine z.T. deutlich verbesserte Selektivität für den  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal der B-Zelle auf (BECKER et al., 2001; LAWSON und DUNNE, 2001; COSGROVE et al., 2002).

#### **1.5.4 CKAs zur Therapie des HI**

Üblicherweise werden Calcium-Kanal-Antagonisten (CKAs) zur Therapie und Prophylaxe der Angina pectoris und der essentiellen Hypertonie eingesetzt. Die blockierende Wirkung auf die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle z.B. in der glatten Gefäßmuskulatur und im Herzen machen CKAs zu wertvollen Therapeutika, die je nach chemischer Struktur und Wirkungsprofil in drei Stoffgruppen klassifiziert werden können. Zur Therapie des HI jedoch ist nur die Gruppe der Dihydropyridine und insbesondere Nifedipin in oralen Dosen von 0,25 bis 2,5 mg / kg / Tag indiziert (BAS et al., 1999; EICHMANN et al., 1999; SHANBAG et al., 2002).



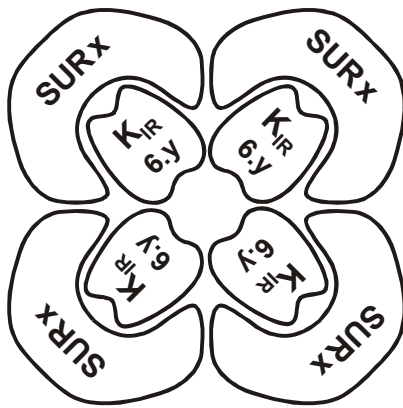
Über eine Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die pankreatische B-Zelle wird die Insulinsekretion verringert und die hypoglykämische Stoffwechsellaage normalisiert (Abb. 4; LINDLEY et al., 1996). Die wichtigste unerwünschte Wirkung, das Auftreten einer arteriellen Hypotonie, die zu konsequenter Überwachung der Blutdruck-Werte zwingt und ein stark variierendes Ansprechen der Patienten auf die Therapie mit Nifedipin begrenzen den Einsatz des Arzneimittels zur Behandlung der Hypoglykämie.

### **1.5.5 Pankreasteilresektion zur Therapie des HI**

Bei Versagen diätetischer und medikamentöser Therapieversuche ist eine operative Pankreasteilresektion indiziert, wobei eine histologisch-morphologische präoperative Klassifikation der vorliegenden Erkrankungsform (fokal oder diffus) dringend erforderlich ist. Während bei der fokalen adenomatösen Form des HI (FoHI) nach Lokalisierung der Läsionen nur Teilbereiche des Pankreas entfernt werden müssen, um Normoglykämie zu erreichen, wird bei der diffusen Form des HI (DiHI) eine subtotale Pankreasresektion mit im Mittel 95%iger Ektomie vorgenommen (DE LONLAY et al., 2002). Diese Resektion führt in nahezu allen Fällen zu chronischen gastrointestinalen Beschwerden und ist mit einem hohen Risiko (etwa 75 - 85 %) der Entwicklung eines insulinpflichtigen Diabetes mellitus in der Pubertät verbunden (LEIBOWITZ et al., 1995; SHILYANSKY et al., 1997). Der sichere präoperative Ausschluss einer fokalen adenomatösen Erkrankungsform vor dem chirurgischen Eingriff ist daher von essentieller Bedeutung.

### **1.6 ATP-sensitive Kalium-Kanäle**

ATP-sensitive Kalium-Kanäle ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanäle) sind Heteromultimere aus einer  $\alpha$ -Untereinheit: einem einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal ( $\text{K}_{\text{IR}6.1}$  oder  $\text{K}_{\text{IR}6.2}$ ; s.a. 1.7) und einer  $\beta$ -Untereinheit: dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR1, SUR2A oder SUR2B; s.a. 1.8). Durch Koexpression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten - und damit Kuvrierung von Retentionssignalen (ZERANGUE et al., 1999) - bildet sich ein funktionsfähiger  $\text{K}_{\text{ATP}}$ -Kanal tetradimerer Struktur (Abb. 5; AGUILAR-BRYAN et al., 1995; INAGAKI et al., 1995a, 1996; ISOMOTO et al., 1996; CLEMENT et al., 1997; AGUILAR-BRYAN et al., 1998), dessen regulatorische SUR-Untereinheiten die porenbildenden  $\text{K}_{\text{IR}}$ -Untereinheiten in einer 4 : 4 - Stöchiometrie ( $\text{SUR}_x/\text{K}_{\text{IR}6.y}_4$ ) umgeben (CLEMENT et al., 1997; AGUILAR-BRYAN et al., 1998).



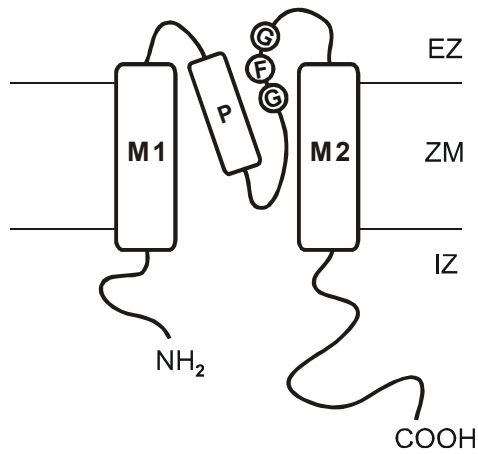
**Abb. 5** Schematische Darstellung der Struktur ATP-sensitiver Kalium-Kanäle. Jeweils vier  $\alpha$ -Untereinheiten  $K_{IR}6.y$  und vier  $\beta$ -Untereinheiten  $SURx$  bilden einen funktionstüchtigen  $K_{ATP}$ -Kanal von tetradimerer Struktur  $(SURx/K_{IR}6.y)_4$ . Dabei ist die Kalium-Kanal bildende Pore von regulatorischen SUR-Untereinheiten umgeben (CLEMENT et al., 1997; AGUILAR-BRYAN et al., 1998).

### 1.7 Die porenbildende Untereinheit des ATP-sensitiven Kalium-Kanals: $K_{IR}6.y$

Innerhalb der einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanäle ( $K_{IR}$ ; inward rectifiers) wurden bislang sieben Unterfamilien (NICHOLS und LOPATIN, 1997; DÖRING et al., 1998) identifiziert und einer einheitlichen Nomenklatur folgend in  $K_{IR}1$  bis  $K_{IR}7$  eingeteilt (CHANDY und GUTMAN, 1993; DOUPNIK et al., 1995). Aus dieser Familie konnten die humanen Isoformen des  $K_{IR}6.1$  und  $K_{IR}6.2$  im Jahre 1995 identifiziert und isoliert werden. Während sich das Gen des humanen  $K_{IR}6.1$  ebenso wie jenes des SUR2 auf Chromosom 12 befindet, ist  $K_{IR}6.2$  in unmittelbarer Nähe zu SUR1 auf Chromosom 11 lokalisiert (INAGAKI et al., 1995a, 1995b, AGUILAR-BRYAN et al., 1998; BABENKO et al., 1998).

Die Proteine  $K_{IR}6.1$  bzw.  $K_{IR}6.2$  mit 424 bzw. 390 Aminosäuren bestehen aus jeweils zwei transmembranären Domänen (M1 und M2) und einer diese Domänen verbindenden Schleife, der sog. P-loop (Abb. 6). Innerhalb dieser Schleife vermittelt die Abfolge dreier Aminosäuren: Glycin-Phenylalanin-Glycin (GFG-Motiv) in Pos. 142 - 144 (für  $K_{IR}6.1$ ) bzw. Pos. 132 - 134 (für  $K_{IR}6.2$ ) die Selektivität für Kalium-Ionen (MACKINNON, 1995). Sowohl das amino-terminale Ende als auch der C-Terminus des  $K_{IR}$  befindet sich auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Jeweils vier  $K_{IR}$ -Untereinheiten lagern sich wahrscheinlich so zusammen, dass die M2-Domänen das Innere der Pore des  $K_{ATP}$ -Kanalkomplexes bilden und somit die  $K^+$ -Leitfähigkeit gewährleisten.

Die Bindungsstelle für inhibitorische Nukleotide wie z.B. ATP ist auf der Kanal-bildenden  $K_{IR}$ -Untereinheit lokalisiert (SHYNG et al., 1997; TUCKER et al., 1997; DRAIN et al., 1998) - die Empfindlichkeit gegenüber SUs, KCOs und Nukleosiddiphosphaten (NDPs) hingegen wird v.a. über die regulatorische SUR-Untereinheit vermittelt (AGUILAR-BRYAN und BRYAN, 1999).



**Abb. 6** Transmembranäre Topologie des *K<sub>IR</sub>6.1* und *K<sub>IR</sub>6.2*. Zwei transmembranäre Domänen (M1 und M2) sind über eine Aminosäureschleife (P-loop; P) verbunden. Das sog. GYG-Motiv innerhalb dieser Region ist kritisch für die Ionen-Selektivität der Kalium-Kanal bildenden Pore (MACKINNON, 1995). Sowohl das aminoterminal Ende (NH<sub>2</sub>) als auch der Carboxy-Terminus (COOH) der  $\alpha$ -Untereinheit ist intrazellulär (IZ) lokalisiert (ZM = Zellmembran, EZ = extrazellulär).

## 1.8 Die regulatorische Untereinheit des ATP-sensitiven Kalium-Kanals: SURx

### 1.8.1 Nachweis in Geweben

Hochaffine Bindungsstellen für SUs wurden erstmals in Insulinomen, insulinsezernierenden Zelllinien und Pankreasinseln nachgewiesen (GEISEN et al., 1985; AGUILAR-BRYAN et al., 1998). Durch die Korrelation zwischen der Blockade von ATP-sensitiven Kalium-Kanälen und der Insulinfreisetzung durch SUs bzw. über Bindungsexperimente an Membranpräparationen wurde gefolgert, dass die hochaffine Bindungsstelle für SUs dem SUR entsprach (SCHMID-ANTOMARCHI et al., 1987; GAINES et al., 1988; SCHWANSTECHER, 1994). Ferner konnten hochaffine Bindungsstellen für SUs auch in Zellmembranen aus Gehirn (KAUBISCH et al., 1982; ASHCROFT und ASHCROFT, 1992; GOPALAKRISHNAN et al., 1993), Herzmuskeln (FOSSET et al., 1988), glatter Muskulatur (KOVACS und NELSON, 1991; GOPALAKRISHNAN et al., 1991; ZINI et al., 1991) und Skelettmuskulatur (GOPALAKRISHNAN et al., 1991) nachgewiesen werden.

Die Isoformen des SUR wurden in den Jahren 1995 bis 1996 kloniert. Dabei gelang es zunächst die für SUs hochaffine Form: SUR1 (AGUILAR-BRYAN et al., 1995) und wenig später zwei für SUs niederaffine Isoformen: SUR2A und SUR2B (INAGAKI et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996) zu detektieren. Das Gen des humanen SUR1 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p15.1) lokalisiert (THOMAS et al., 1995; AGUILAR-BRYAN et al., 1998) und das der SUR2-Varianten auf Chromosom 12 (12p11.12), wobei SUR2A und SUR2B „splice“-Produkte eines Gens darstellen und sich lediglich in den letzten 42 C-terminalen Aminosäuren unterscheiden (CHUTKOW et al., 1996; 1999; ISOMOTO et al., 1996; DAVIS-TABER et al., 2000).

SUR1 und K<sub>IR</sub>6.2 rekonstituieren die K<sub>ATP</sub>-Kanäle pankreatischer B-Zellen und von Neuronen (INAGAKI et al., 1995a; SCHWANSTECHE und BASSEN, 1997). Während SUR2A/K<sub>IR</sub>6.2-Kanäle wahrscheinlich die K<sub>ATP</sub>-Kanäle des Herzens und der Skelettmuskulatur (INAGAKI et al., 1996; BABENKO et al., 1998; OKUYAMA et al., 1998) bilden, repräsentieren SUR2B und K<sub>IR</sub>6.1 vermutlich die K<sub>ATP</sub>-Kanäle der glatten Muskulatur (INAGAKI et al., 1996; ISOMOTO et al., 1996; YAMADA et al., 1997; SEINO, 2003).

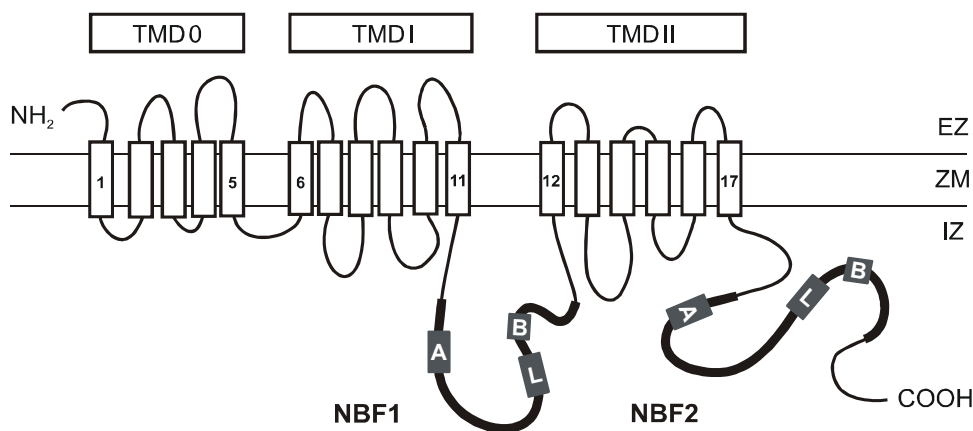
### 1.8.2 SURs sind ABC-Proteine

SURs sind wie das MDR (Multidrug Resistance Protein; P-Glycoprotein, Pgp) oder der CFTR-Chlorid-Ionenkanal (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) Mitglieder der Familie der ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC-Proteine; ATP binding cassette; HIGGINS, 1992; 1995; HOLLAND und BLIGHT, 1999), die eine der größten Proteinfamilien und vermutlich die größte Gruppe von Proteinen für den selektiven Transport von Substanzen durch Biomembranen repräsentieren (YOUNG und HOLLAND, 1999). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine gemeinsame Grundstruktur. Eine dieser Struktureinheiten besteht aus zwei Kerndomänen: einer hydrophoben transmembranären Domäne (TMD) und einer cytoplasmatisch lokalisierten Untereinheit - der Nukleotid-bindenden Domäne (NBF, nucleotide binding fold). Die Organisation typischer funktionsfähiger ABC-Proteine beruht auf zwei dieser Basiseinheiten mit insgesamt also jeweils zwei TMDs und zwei NBFs.

Die beiden NBFs befinden sich auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran und koppeln bei zahlreichen Vertretern der Gruppe die Hydrolyse von ATP an den Substanztransport (MIMMACK et al., 1989; HIGGINS, 1992; 1995). Charakteristisch für die NBFs sind sowohl die beiden Walker Motive, Walker A und Walker B, die als Bestandteile der Nukleotid-bindenden Tasche an der Stabilisierung des ATP und des Mg<sup>2+</sup>-Ions beteiligt sind (4.2; WALKER et al., 1982; SARASTE et al., 1990), als auch die sog. Linker Region, die vermutlich an der Übertragung der Konformationsänderung nach erfolgter ATP-Bindung und / oder Hydrolyse in den NBFs auf andere Teile des Proteins beteiligt ist (SHYAMALA et al., 1991; MIMURA et al., 1991).

1997 wurde für die SUR1-Isoform des SUR in Anlehnung an den charakteristischen Aufbau anderer ABC-Transporter eine Topologie mit extrazellulärem Amino-Terminus und fünf (für TMD0) bzw. sechs (für TMDI) transmembranären Segmenten vor NBF1 und weiteren sechs (TMDII) zwischen NBF1 und der NBF2 postuliert (TUSNADY et al., 1997) - eine Gliederung, die übereinstimmend mit dem „two-times-six helix paradigm“ (HIGGINS,

1992) von zwei membranären Regionen mit je sechs membranspannenden Segmenten (TMDI und TMDII) ausgeht und eine weitere N-terminale TMD (TMD0) besitzt. Beide NBFs als auch der Carboxy-Terminus sind dabei intrazellulär lokalisiert (Abb. 7). Dieses Modell konnte inzwischen mit nur geringfügiger Modifikation durch Hydrophobizitäts-Plots und Markierungen nativer Glykosilierungssites verifiziert werden (RAAB-GRAHAM, 1999; CONTI et al., 2001). Aufgrund der strukturellen Homologie, ähnlichen Eigenschaften und Hydrophobizitäts-Mustern besitzen die SUR2-Isoformen höchstwahrscheinlich eine identische Topologie (CONTI et al., 2001).



**Abb. 7** *Transmembranäre Topologie des SUR.* Der humane SUR1 umfasst 1582, die SUR2-Varianten jeweils 1545 Aminosäuren. Die membranäre Organisation gliedert sich je in 3 transmembranäre Domänenabschnitte - mit TMD0, welche die membranspannenden Segmente 1 bis 5, TMDI die Segmente 6 bis 11 und TMDII die Segmente 12 bis 17 umfasst (CONTI et al., 2001). Während der N-Terminus extrazellulär (EZ) lokalisiert ist, finden sich der C-Terminus und die NBFs intrazellulär (IZ). Die für ABC-Transporter charakteristischen Motive beider NBFs: Walker A (GX<sub>4</sub>GKS/T), Walker B (R/KX<sub>6-8</sub>LHyd<sub>4</sub>D) und die Linker-Region (LSGGX<sub>3</sub>RHydXHydA) sind in der Abbildung mit „A, B und L“ gekennzeichnet (X = beliebige AS, Hyd = AS mit hydrophobem Rest, ZM = Zellmembran; WALKER et al., 1982; SARASTE et al., 1990; SHYAMALA et al., 1991; MIMURA et al., 1991).

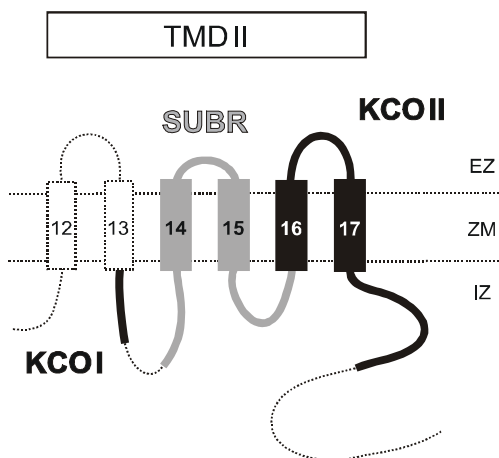
### 1.8.3 Bindungsstellen für SUs und KCOs in SURs

K<sub>ATP</sub>-Kanäle verschiedener Gewebe (1.8.1) zeigen charakteristische pharmakologische Eigenschaften. Dabei wird die Empfindlichkeit der Kanäle gegenüber Pharmaka über die regulatorische SUR-Untereinheit vermittelt. Während SUR1 eine hohe Affinität für die Bindung von Sulfonylharnstoffen (SUs; z.B. Glibenclamid) und eine deutlich niedrigere Affinität für die Bindung von Kalium-Kanal-Öffner (KCOs; z.B. P1075, Pinacidil) aufweist,

zeigen die SUR2-Isoformen eine hochaffine Bindung von KCOs und eine deutlich reduzierte Affinität für SUs (SIEVERDING, 1998a; DÖRSCHNER et al., 1999; SCHWANSTECHEER et al., 1998). Die Offenwahrscheinlichkeit intakter  $K_{ATP}$ -Kanäle wird durch SUs reduziert und durch KCOs erhöht (s.a. 1.8.3.1 und 1.8.3.2).

### 1.8.3.1 Lokalisation der Bindungsstelle für SUs

Durch Interaktion von SUs mit ihrer hochaffinen Bindungsstelle auf dem SUR wird die Wirkung auf den ATP-sensitiven Kalium-Kanal vermittelt (1.6; STURGESS et al., 1985; TRUBE et al., 1986; ASHCROFT und RORSMAN, 1989; ASHFORD, 1990). Diese Bindungsstelle ist cytoplasmatisch lokalisiert (SCHWANSTECHEER et al., 1994) und umfasst eine Region aus 114 Aminosäuren innerhalb der TMDII (UHDE et al., 1999). Die Sulfonylharnstoff-bindende Region (Sulfonylurea binding region, SUBR) besteht aus der transmembranären Region (TMR) 14 und 15 mit dazwischenliegender extrazellulärer Schleife, sowie einem Teilbereich der intrazellulären Schleife vor Beginn der TMR14 und dem Bereich im Anschluss an die TMR15 bis TMR16 (Abb. 8; ASHFIELD et al., 1999; UHDE et al., 1999; TOMAN, 2001). Untersuchungen zur Stöchiometrie der Wirkung von SUs zeigten, dass das Besetzen einer der vier Bindungsstellen für SUs pro Kanalkomplex ausreichend ist, um SUR1/ $K_{IR6.2}$ - bzw. SUR2/ $K_{IR6.2}$ -Kanäle zu schließen (DÖRSCHNER et al., 1999).



**Abb. 8** Lokalisation der Bindungsstellen für SUs und KCOs. Innerhalb der TMDII wurden 3 Bereiche identifiziert, die kritisch sind für die Bindung von SUs (SUBR) und KCOs (KCOI und KCOII). Die SUBR (grau dargestellt) umfasst 114 Aminosäuren von Cystein in Pos. 1129 bis Threonin in Pos. 1242 in SUR1 (UHDE et al., 1999; TOMAN, 2001), die KCOI 28 Reste von Threonin in Pos. 1059 bis Leucin in Pos. 1087 und die KCOII 102 Aminosäuren von Arginin in Pos. 1218 bis Asparagin in Pos. 1320 (jeweils in SUR2-Nummerierung; UHDE et al., 1999; KCOI und KCOII sind schwarz dargestellt; EZ = extrazellulär; ZM = Zellmembran; IZ = intrazellulär).

### **1.8.3.2      *Lokalisation der Bindungsstelle für KCOs***

Ebenso wie für SUs gezeigt, ist die Rezeptorbindungsstelle für KCOs auf dem SUR lokalisiert (SCHWANSTECHEER et al., 1998). Mit Hilfe gezielt konstruierter Chimären zwischen den Isoformen SUR1 und SUR2B konnten zwei Bereiche eingegrenzt werden, die essentiell sind für die Bindung von KCOs an den Rezeptor (UHDE et al., 1999). Diese Bindungsstellen innerhalb der TMDII, KCOI und KCOII, sind kritisch für die Ausbildung hoher KCO-Affinität. KCOI besteht mit 28 Aminosäuren aus einem nur kleinen Teil der intrazellulären Schleife zwischen TMR 13 und TMR 14, während KCOII mit 102 Resten die TMR 16 und 17 inkl. extrazellulärer Verbindung der TMRs und einen intrazellulären Teilbereich von TMR 17 bis zum Beginn der NBF2 umfasst (Abb. 8; UHDE, 2001). Analog zur stöchiometrischen Situation bei den SUs ist zur Aktivierung des Kanals durch KCOs das Besetzen einer der vier möglichen Bindungsstellen pro Kanalkomplex ausreichend (GROSS et al., 1999).

### **1.8.3.3      *Die Bindungsstellen für KCOs und SUs sind negativ-allosterisch aneinander gekoppelt***

Frühere Untersuchungen ergaben, dass die Bindung von KCOs an den SUR eine Bindung und / oder Hydrolyse von ATP erfordert. Ähnlich regulatorischer GTPasen (WITTINGHOFFER und PAI, 1991; ABEL et al., 1996) agiert der SUR dabei vermutlich als molekularer Schalter, der durch Hydrolyse von ATP in den NBFs aus seiner insensitiven in die sensitive Konformation geschaltet werden kann - ein Zustand, der empfindlich ist für die Bindung von KCOs (z.B. P1075, Pinacidil) und physiologischen NDPs (z.B. MgADP, MgGDP; SCHWANSTECHEER et al., 1992c; 1998). Die Bindungsstellen für KCOs und SUs sind auf den physiologisch vorkommenden Isoformen der SURs negativ-allosterisch aneinander gekoppelt (SCHWANSTECHEER und RIETZE, 1990; SCHWANSTECHEER et al., 1991a; 1991b; 1992a; 1992b; 1992d). Somit ist über allosterische Verdrängung der hochaffin-gebundenen Liganden eine indirekte Bestimmung der Affinitäten von Liganden möglich, die auf dem SUR eine nur niederaffine Bindung zeigen (SCHWANSTECHEER et al., 1998; DÖRSCHNER et al., 1999). Durch Konstruktion von Chimären mit unterschiedlichen C-Termini und Untersuchung der Konstrukte auf die Kopplung der Bindungsstellen für SUs und KCOs konnte der C-Terminus als kritisch für die allosterische Interaktion erkannt werden (TOMAN, 2001).

## **2 Zielsetzung der Arbeit**

1. Mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien sollten die funktionellen Konsequenzen von Mutationen in den NBFs des SUR2A untersucht werden.
2. Mittels Analogieschluss sollten 3D-Modelle für die NBFs des SUR entwickelt werden.
3. Diese Modelle sollten durch Mutationsanalysen experimentell getestet werden.
4. Die Ergebnisse sollten dazu dienen, die derzeitigen Vorstellungen über die funktionelle Relevanz der NBFs zu prüfen und zu verbessern.
5. Schließlich sollten die molekularen Mechanismen der allosterischen Interaktion zwischen den Bindungsstellen für SUs und KCOs durch Identifizierung beteiligter Protein-Regionen weiter charakterisiert werden.



### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Punktmutationen und chimäre Konstrukte**

##### **3.1.1 Puffer und Lösungen**

###### *A) Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Lyophilisierte Oligonukleotide einer Länge von ca. 25-40 Basen (Auftragssynthese, Fa. Roth, Karlsruhe) wurden nach Angabe des Syntheseprotokolls (Oligo-Datenblatt) mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser zu einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. Aliquote dieser Lösungen wurden mit autoklaviertem, bidestilliertem Wasser auf eine Endkonzentration von 100 ng/µl verdünnt.

###### *B) 0,5 M EDTA (pH 8,0)*

93,1 g Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 400 ml bidestilliertem Wasser gelöst und mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Nach Ergänzen mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 500 ml wurde die Lösung autoklaviert.

###### *C) TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)*

242 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden mit 100 ml 0,5 M EDTA-Lösung (3.1.1 B), 57,1 ml Essigsäure 99,8 % (Eisessig; Bernd Kraft GmbH, Duisburg) und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml gelöst. Vor Gebrauch des Puffers wurde diese Stammlösung mit bidestilliertem Wasser 1:50 verdünnt.

###### *D) Agaroselösung (1%)*

3,5 g Agarose (Agarose NEEO - Rotigarose für die Elektrophorese; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden unter Erwärmen in 350 ml TAE-Puffer (3.1.1 C) gelöst.

###### *E) Tris-Puffer (1 M)*

12,1 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden in 90 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der jeweilige pH-Wert mit 1 N HCl eingestellt und auf ein Endvolumen von 100 ml verdünnt.

#### *F) Rapid Ligation Puffer (2-fach)*

In Anlehnung an das *LigaFast<sup>TM</sup> Rapid DNA Ligation System* (Fa. Promega, Mannheim) wurden 203,3 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt), 154,3 mg 1,4-Dithio-threitol (DTT; Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 60,52 mg Adenosintriphosphat-Trihydrat ( $\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ; Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und 5 g Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) mit 3 ml 1 M Tris-HCl pH 7,8 (3.1.1 E) und bidestilliertem, autoklaviertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 ml gelöst. Die Lösung wurde aliquotiert bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt und im Ligationsansatz 1:1 verdünnt.

### **3.1.2 cDNA und Plasmide**

Als DNA-Matrizen (Template-DNA) wurden stets Plasmide, d.h. zirkuläre DNA-Moleküle eingesetzt, bei der die komplementäre DNA (cDNA) der Zielproteine (SUR-Isoformen bzw. Punktmutationen und Chimären) in Vektoren (pECE oder pCMV6c) ligiert sind. Es wurde jeweils entweder die cDNA des SUR1 des Hamsters (ham SUR1, Kenn-Nr.: L40623), des SUR2A der Ratte (rat SUR2A, Kenn-Nr.: NM\_013040) und des SUR2B der Ratte (rat SUR2B, Kenn-Nr.: AF087838) bzw. die cDNA chimärer Konstrukte aus unterschiedlichen SUR-Isoformen verwendet. Die cDNA des ham SUR1 befand sich in einem pECE- (AGUILAR - BRYAN et al., 1999) und die des rat SUR2A und rat SUR2B in einem pCMV6c-Vektor.

### **3.1.3 Primer-Design**

Als Primer kamen Oligonukleotid-Sequenzen in einer Länge von ca. 25-40 Basen (3.1.1 A) zur Anwendung, die jeweils komplementär zu dem 3'- und dem 5'- Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes konstruiert wurden. Das zu verändernde Basenpaar oder die zu verändernden Basenpaare waren etwa inmitten der Primer lokalisiert. Sowohl in 3'- als auch in 5'-Richtung der Punktmutationen („upstream“ und „downstream“) fanden sich also ca. 10-15 Basenpaare (bp) zur DNA-Matrize (Template) spezifisch komplementär (UHDE, 2001). Die Schmelztemperatur der Oligonukleotid-Primer ( $T_m$ ), die in allen Fällen bei  $78 \pm 3^\circ\text{C}$  lag, wurde nach Formel (1) ermittelt (SAMBROOK et al., 1989; RYCHLIK et al., 1990):

$$(1) \quad T_m = 81,5 + 0,41 \cdot (\%GC) - 675/N - (\%_{(\Delta P/T)})$$

%GC = Prozentualer Anteil der Basen Guanin (G) und Cytosin (C) am gesamten Oligonukleotid-Primer (>40%)

N = Länge des Oligonukleotid-Primers in bp (25-40)

%<sub>( $\Delta P/T$ )</sub> = Abweichung der Oligonukleotid-Primersequenz (P) von der Templatesequenz (T) in % (mismatch)

### 3.1.4 Punktmutationen (Site-directed Mutagenesis)

Punktmutationen wurden mit programmierbaren Thermo Cyclern vom Typ Primus 25 (Fa. MWG BIOTECH GmbH, Ebersberg) in 0,2 ml PCR Softtubes (Fa. Biozym Diagnostik, Oldendorf) mit Hilfe des „QuickChange<sup>TM</sup> Site-directed Mutagenesis“-Verfahrens (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) erzeugt. Diese Methode nutzt die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) zur Herstellung gezielter Punktmutationen (MULLIS und FALOONA, 1987; SAIKI et al., 1988).

Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt neben autoklaviertem, bidestilliertem Wasser 50 ng einer Matrizen-DNA (3.1.2), jeweils 125 ng zweier synthetischer Oligonukleotid-Primer (mit den gewünschten Basenaustauschen (3.1.1 A und 3.1.3) und jeweils komplementär zu dem 3'- und dem 5'- Ende des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes) und einen Reaktionspuffer (10x Cloned Pfu Reaction Buffer; Fa. Boehringer, Mannheim) mit dem die folgenden Endkonzentrationen eingestellt wurden: 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8,8, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 µg/µl BSA (nuklease-freies Rinderserumalbumin), 0,1 % Triton<sup>®</sup> X-100. Außerdem enthielt der Ansatz 250 µM dNTP-Mix mit dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe), so dass sich eine Endkonzentration von jeweils 65 µM ergab. Nach Zugabe von 2,5 Einheiten einer *proof-reading PfuTurbo<sup>TM</sup>* bzw. *PfuUltra<sup>TM</sup>* DNA Polymerase (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) wurde die PCR gestartet. Die PCR-Programme umfassten zwischen 12 und 20 Reaktionszyklen und wurden nach folgendem Standard durchgeführt: Zur Denaturierung der doppelsträngigen Plasmid-DNA wurde der Ansatz initial für 1 min und zu Beginn jedes weiteren Zyklus 30 s auf 95 °C erwärmt. Nach einem einminütigem Intervall bei einer Temperatur zwischen 55 und 65 °C (je nach Schmelztemperatur der Primer), in dem die Bindung der Oligonukleotide an der Template-DNA ermöglicht wurde (Hybridisierung),

erfolgte die Neusynthese der DNA ausgehend von doppelsträngigen Fragmenten der Template-Primer-Paarungen. Mit einer Synthesegeschwindigkeit von ca. 500 bp je min wurden die Primer durch die DNA-Polymerase bei 68 °C - der optimalen Arbeitstemperatur der *Pfu*-Polymerasen - verlängert (Elongation), wonach der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation von neuem gestartet wurde (SAMBROOK et al., 1989). Nach Beendigung der Reaktionszyklen wurde der PCR-Ansatz mit 10 Einheiten *DpnI* (Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert.

Die Restriktionsendonuklease *DpnI* schneidet spezifisch durch Bakterien methylierte und hemimethylierte DNA. Unmethylierte PCR-Produkte hingegen werden nicht erkannt und nicht verdaut. Ein *DpnI*-Verdau verhindert eine Transformation des intakten Template-Plasmids.

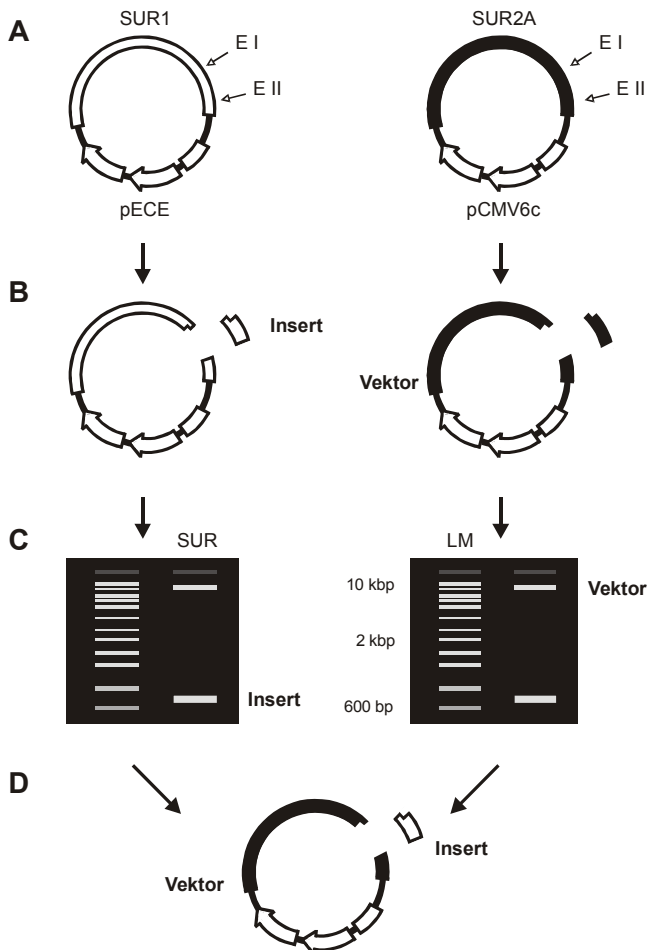
### 3.1.5 Kontrolle der PCR-Produkte

Nach Beendigung der PCR und des *DpnI*-Verdaus wurde ein Aliquot des Reaktions-Ansatzes von 15 µl in einem 1 %igen Agarosegel (3.1.1 D) elektrophoretisch gegen einen Längenstandard (GeneRuler™ DNA Ladder Mix; Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetrennt. Dabei wandern die geladenen DNA-Moleküle von der Kathode zur Anode.

Die erwärmte, flüssige Agaroselösung wurde bei einer Temperatur von ca. 55-60 °C zum Erkalten direkt in die Gelkammer (Mini-Sub Cel GT; Fa. Bio Rad Laboratories Inc., Hempstead, UK) gegossen, in der zuvor ein Probenkamm befestigt worden war. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde es mit TAE-Puffer (3.1.1 C) überschichtet und die Proben wurden - nach Entfernung des Kamms - mit Ladepuffer (6-fach Loading Buffer, Fa. MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Stromstärke von 400 mA und einer Spannung von 40-75 V mit Hilfe eines Power Pac 300 (Fa. Bio Rad Laboratories Inc., Hempstead, UK) gegen einen Längenstandard über 2 bis 3 Stunden. Um die getrennten DNA-Banden zu detektieren, wurde das Gel zunächst für etwa 10 bis 20 min in einem Ethidiumbromid-Bad eingefärbt (Ethidiumbromid 0,5 µg/ml; Fa. Boehringer, Mannheim) und anschließend unter UV-Licht ausgewertet (UV-Transilluminator UVT-28 M, Fa. Herolab, Wiesloch). Ethidiumbromid lagert sich zwischen GC-Basenpaarungen ein und bildet einen Komplex, der unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. War eine DNA-Bande in der erwarteten Länge unter Ausschluss von Nebenprodukten zu erkennen, wurde das PCR-Produkt in *E. coli* Bakterien transformiert (3.2).

### 3.1.6 Chimäre Konstrukte

Chimären (Proteine, die z.B. aus Segmenten differenter Isoformen des SUR zusammengesetzt sind) wurden durch Rekombination der cDNA des ham SUR1 und der des rat SUR2A bzw. rat SUR2B hergestellt. Dabei wurden zwei DNA-Fragmente zu einem neuen Plasmid kombiniert. Fragment 1 enthielt neben Abschnitten des SUR kodierende Bereiche des Vektors wie z.B. für die Amplifikation und Ampicillinresistenz (Vektor-DNA). Fragment 2 (Insert) enthielt ausschließlich Bereiche der cDNA des Zielproteins. In Abb. 9 ist exemplarisch die Planung eines chimären Konstruktes aus der cDNA des ham SUR1 und der des rat SUR2A dargestellt.



**Abb. 9 Planung einer Chimäre.** Teil **A** der Abbildung zeigt schematisch die verwendeten Plasmide der Sulfonylharnstoffrezeptor-Isoformen. Die cDNA des SUR1 befindet sich im pECE-Vektor und die des SUR2A im pCMV6c. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen EI und EII sind in den Plasmiden entweder nativ und singulär vorhanden oder durch Punktmutationen gezielt eingeführt worden. Die Teile **B** und **C** der Abbildung zeigen den parallelen Restriktionsverdau der Plasmide in getrennten Ansätzen zu Vektor-DNA (7,5 Kilo-Basenpaare, kbp) bzw. Insert (0,9 kbp) und die anschließende elektrophoretische Trennung der DNA-Fragmente gegen einen Längenstandard (Ladder Mix, LM). Nach Extraktion der DNA-Banden aus dem Agarosegel und Reinigung der kruden DNA erfolgt die Ligation der DNA-Fragmente zu einem rekombinanten Plasmid (**D**).

Für die gezielte Erzeugung von chimären Konstrukten mussten Schnittstellen entsprechender Restriktionsendonukleasen in den cDNAs der SUR-Isoformen entweder singulär und nativ vorhanden sein oder durch Punktmutationen gezielt in die jeweilige cDNA eingebracht werden. Waren die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme weder nativ vorhanden, noch durch stille Mutationen erzeugbar, wurden diese durch eine PCR (3.1.4) eingeführt und nach Austausch und Ligation der korrespondierenden Bereiche (3.1.8) durch eine weitere PCR anschließend wieder rückmutiert.

Die cDNA der SUR-Isoformen wurde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach Anweisung der Datenblätter meist für 30 bis 60 min bei 37 °C verdaut, die geschnittenen DNA-Fragmente über ein Agarosegel (3.1.1 D) elektrophoretisch getrennt, im Ethidiumbromidbad gefärbt (3.1.5) und die gewünschten Banden mit Hilfe eines scharfen Skalpells unter UV-Licht (3.1.5) aus dem Gel extrahiert. Zur Aufreinigung der kruden DNA wurde ein Agarosegel-Extraktions-Kit (QIAquick® Gel Extraction Kit, Qiagen GmbH, Hilden) verwendet. Nach UV-metrischer Bestimmung der DNA-Konzentrationen bei einer Wellenlänge von 260 nm (UVIKON 932 Spectrophotometer; Kontron Instruments, Eching), Dephosphorylierung des Vektors (3.1.7), Ligation (3.1.8) und Transformation (3.2) konnte durch Sequenzierung (3.4.1) die korrekte Basenabfolge des Endprodukts verifiziert werden. Zur Untersuchung des chimären Proteins wurde das rekombinante Plasmid in COS1-Zellen transfiziert (3.6), exprimiert und nach einer Membranpräparation (3.7) in z.B. Bindungsexperimenten (3.8) charakterisiert.

### **3.1.7 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen**

Um zu verhindern, dass die mit einer Restriktionsendonuklease gespaltene Vektor-DNA wieder mit sich selbst ligierte (Religation), wurden die geschnittenen Vektoren mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt. Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse der für eine Religation benötigten endständigen 5'-Phosphatgruppe.

Direkt nach einer Restriktion wurde der Ansatz mit 0,1 Einheiten der Phosphatase (CIP; Fa. New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Diese Dephosphorylierungsreaktion reduziert die Anzahl an Religationen bei gleichzeitiger Erhöhung der Ausbeute an rekombinanten Plasmiden nach der Transformation (3.2).

### 3.1.8 DNA-Ligation

Bei einer Ligation werden zwei oder mehr DNA-Fragmente zu einem durchgehenden Doppelstrang verknüpft. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase (Fa. Promega, Mannheim) in Anwesenheit von ATP die Ausbildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen.

Die Ligation erfolgte in sterilen 0,2 ml PCR Softtubes (Fa. Biozym Diagnostik, Oldendorf) nach dem Rapid Ligations-Verfahren (PHEIFFER und ZIMMERMANN, 1983) und je nach Art des Restriktionsschnitts bei einer Temperatur von 4-8 °C für 6 bis 12 Stunden bei glatten Enden (blunt ends) bzw. 15-20 °C für 30 min bis 4 Stunden bei überhängenden Enden (sticky ends) der DNA-Fragmente in Thermo Cyclern vom Typ Primus 25 (Fa. MWG BIOTECH GmbH, Ebersberg). Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10-20 µl enthielt neben bidestilliertem, autoklaviertem Wasser und 100-200 ng DNA im Verhältnis des Vektors zum Insert von 1:1 bis 1:10, 1,5 Einheiten der T4-DNA-Ligase und in Anlehnung an das *LigaFast<sup>TM</sup> Rapid DNA Ligation System* (Fa. Promega, Mannheim) eine Puffer-Endkonzentration von 30 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 5 % PEG.

Als Kontrolle diente ein Religations-Ansatz, der ausschließlich die Vektor-DNA in phosphorylierter bzw. 5'-dephosphorylierter Form enthielt (SAMBROOK et al., 1989).

## 3.2 Transformation

Eine Transformation (Transfer von z.B. PCR- bzw. Ligationsprodukten in Bakterienzellen) ermöglicht die Reduplikation der in die Plasmidvektoren eingebrachten DNA-Fragmente durch Kultivierung eines transformierten Bakterienklons (COHEN et al., 1972).

### 3.2.1 Lösungen und Medien

#### A) Glucoselösung (1 M, steril)

19,82 g Glucose-Monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> · H<sub>2</sub>O; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in bidestilliertem, autoklaviertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml gelöst und durch ein Filter unter Verwendung eines Spritzenvorsatzes Filtropur S 02 der Porengröße 0,2 µm (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) sterilfiltriert.

*B) Kaliumchlorid-Lösung (0,25 M, steril)*

1,86 g Kaliumchlorid (KCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 95 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N KOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml gebracht und autoklaviert.

*C) Magnesiumchlorid-Lösung (1 M, steril)*

20,3 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml bidestilliertem, autoklaviertem Wasser gelöst und nach Sterilfiltration (3.2.1 A) bei 4 °C gelagert.

*D) Magnesiumsulfat-Lösung (1 M, steril)*

24,6 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml bidestilliertem, autoklaviertem Wasser gelöst und nach Sterilfiltration (3.2.1 A) bei 4 °C gelagert.

*E) LB-Medium (Luria-Bertani-Medium, steril)*

10 g Pepton (Select Peptone 140) und 5 g Hefeextrakt (Select Yeast Extract; beides Fa. Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurden mit 0,5 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 10 ml 0,25 M Kaliumchlorid-Lösung (3.2.1 B) in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser zu einem Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und nach Autoklavierung bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

*F) NZY-Medium (steril)*

10 g NZ Amine (Caseinhydrolysat, säurehydrolysiert; Fa. Roth, Karlsruhe), 5 g Hefeextrakt (Select Yeast Extract; Fa. Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und 5 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 950 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser zu einem Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und nach Autoklavierung bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Vor Gebrauch wurden zu je 100 ml dieser Lösung 2 ml einer 1 M Glucose-Lösung (3.2.1 A) und jeweils 1,25 ml einer 1 M Magnesiumchlorid-Lösung (3.2.1 C) und 1 M Magnesiumsulfat-Lösung (3.2.1 D) hinzugefügt.



*G) Ampicillin-Stammlösung (50 mg/ml)*

1 g Ampicillin (Fa. Boehringer, Mannheim) wurde in 20 ml bidestilliertem Wasser gelöst, die Lösung sterilfiltriert (3.2.1 A) und aliquotiert bei -20 °C vor Licht geschützt aufbewahrt.

*H) LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml)*

Unter Erwärmung wurden 6 g Agar-Agar (Fa. Roth, Karlsruhe) in 400 ml LB-Medium (3.2.1 E) gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 50 bis 60 °C wurden unter der Reinraumwerkbank 800 µl der Ampicillin-Stammlösung (3.2.1 G) zugesetzt, vorsichtig unter Vermeidung von Blasenbildung gemischt und jeweils ca. 20 ml dieser Lösung in Petrischalen (92 mm Durchmesser, Fa. Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Nach dem Erkalten und Erstarren des LB-Agars konnten die Platten luftdicht verschlossen bis zu 4 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

*I) Medium A zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

493 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 400 mg Glucose-Monohydrat (Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 200 ml LB-Medium (3.2.1 E) gelöst. Nach Sterilfiltration (3.2.1 A) wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

*J) Medium B zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien*

296 mg Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt), 12 g Polyethylenglykol (PEG 8000; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 36 ml Glycerin (Glycerol, wasserfrei, reinst; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit LB-Medium (3.2.1 E) zu einem Endvolumen von 100 ml gelöst. Nach Sterilfiltration (3.2.1 A) wurde die Lösung bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Transformationskompetente Zellen wurden unter Verwendung von Polyethylenglykol in einer Modifikation der klassischen PEG-Methode (NISHIMURA et al., 1990; TANG et al., 1994) hergestellt. Mit PEG vorbehandelte Zellen besitzen die Eigenschaft, Fremd-DNA effizient aufnehmen zu können.

5 ml LB-Medium (3.2.1 E) wurden mit einer Kolonie E. coli-Zellen (Epicurian Coli XL1-Blue; Fa. Stratagene, Amsterdam, NL) beimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator (Innova 4300, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen) bei 37 °C kultiviert.

Nach einer Inkubationszeit von 14 bis 18 Stunden wurden aus der Übernachtskultur 500 µl Zellsuspension entnommen, zum Animpfen in 50 ml Medium A (3.2.1 I) überführt und im Schüttelinkubator erneut bei 37 °C für 2 bis 4 Stunden kultiviert bis eine optische Dichte von 0,55 bei 578 nm erreicht war (UVIKON 932 Spectrophotometer; Kontron Instruments, Eching). Die Bakterienkultur wurde für 10 min auf Eis gekühlt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert (Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 290.9, 2900 Upm, Fa. Jouan GmbH, Unterhaching). Das Zellsediment wurde nach Resuspendierung in 500 µl eiskaltem Medium A (3.2.1 I) mit 2,5 ml Medium B (3.2.1 J) vorsichtig gemischt und nach einer Schockfrostung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) in Aliquoten zu 100 µl bei -70 °C bis zu einem Jahr gelagert.

### **3.2.3 Durchführung einer Transformation**

50-100 µl PEG-transformationskompetente Zellen (3.2.2) wurden auf Eis aufgetaut und in einem sterilen Reaktionsgefäß mit 1-4 µl des PCR-Produktes (3.1.4) bzw. 2-8 µl des Ligationsansatzes (3.1.8) versetzt, vorsichtig gemischt und im Eisbad für 15-30 min inkubiert. Nach einer Erwärmung für 45 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad, wurde der Ansatzes sofort für 2 weitere min im Eisbad gekühlt, mit 500 µl NZY-Medium (3.2.1 F) versetzt und für 45-60 min im Schüttelinkubator (3.2.2) kultiviert. Die Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (3.2.1 H) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C inkubiert. Eine nach 14-18 Stunden gewachsene Bakterienkolonie wurde in 10 ml LB-Medium (3.2.1 E), dem zuvor 20 µl Ampicillin-Stammlösung (3.2.1 G) zugesetzt wurde, überführt und im Schüttelinkubator für eine anschließende Plasmidpräparation (3.3) weitere 14-18 Stunden inkubiert.

## **3.3 Plasmidpräparation**

Zur Extraktion der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden verschiedene Präparationsmethoden verwendet, wobei sich die Auswahl des jeweiligen Verfahrens nach der benötigten Menge und Art der Weiterverwendung der extrahierten DNA-Plasmide richtete. Wurde die Plasmid-DNA ausschließlich zum Zweck eines Verdaus mit Restriktionsendonukleasen, anschließender gelelektrophoretischer Trennung und zur Kontrolle des Schnittmusters der DNA-Fragmente gewonnen, konnte die sog. „boiling“- oder *STET*-Methode der Plasmid-

präparation eingesetzt werden. Dieses Verfahren ist schnell und einfach durchzuführen und liefert ausreichend reine DNA-Mengen für analytisches Arbeiten. Für präparative Zwecke wie z.B. Sequenzierungsreaktionen oder Transfektionen (3.6) wurde die Plasmid-DNA über eine *Säulenpräparation* gewonnen. Diese zeit- und kostenintensivere Methode erlaubt die Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA.

In allen Fällen wurde zur Erhaltung eines bestimmten Bakterienklons (Punktmutation oder chimäres Konstrukt) ein Aliquot einer dicht gewachsenen Übernachtskultur (3.2.2) für spätere Zwecke kryokonserviert (3.4.3).

### 3.3.1 Präparation nach der „boiling“- oder STET-Methode

#### 3.3.1.1 Puffer und Lösungen

##### A) STET-Lösung (pH 8,0)

0,8 g Saccharose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ; Fa. Merck, Darmstadt), 50  $\mu$ l Triton<sup>®</sup> X-100 (Fa. Boehringer, Mannheim) und 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0 (3.1.1 E) wurden zur sofortigen Verwendung mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 ml gelöst und kalt gestellt.

##### B) Lysozym-Lösung (200 U/ $\mu$ l)

2 mg Lysozym (100.000 U/mg; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 1 ml frisch hergestellter STET-Lösung (3.3.1.1 A) aufgenommen und vorsichtig gelöst. Diese Lösung wurde bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt.

##### C) Natriumacetat-Lösung (3 M, pH 5,2)

4,1 g Natriumacetat-Trihydrat ( $Na(CH_3CO_2) \cdot 3 H_2O$ , kristallin, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 9 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 5,2 gebracht und mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt.

##### D) TE-Puffer (Tris/EDTA-Puffer)

121 mg Tris (3.1.1 E) und 37,2 mg Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz - Dihydrat (EDTA; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 80 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,0 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

*E) TE-RNase-Puffer*

10 mg RNase A (Fa. Boehringer, Mannheim) wurden in 1 ml bidestilliertem autoklaviertem Wasser gelöst und bei -20 °C aufbewahrt. 4 µl dieser Stammlösung (10 mg/µl) wurden mit 1 ml TE-Puffer (3.3.1.1 D) gemischt und bis zum Gebrauch auf Eis gekühlt.

**3.3.1.2 Prinzip und Durchführung der „boiling“- oder STET-Methode**

Durch die Einwirkung von EDTA, Triton® X-100 und Lysozym wird bei einer noch weitgehend intakten Cytoplasmamembran die Zellwand der Bakterien zerstört. Durch einen Hitzeschock kann die Plasmid-DNA von anderen Cytosolbestandteilen, chromosomaler DNA und RNA isoliert werden, da zwar sowohl Proteine, chromosomale DNA und RNA als auch die Plasmid-DNA denaturieren, jedoch aufgrund der geringen Komplexität und der vorhandenen Ringstruktur nur die Plasmid-DNA renaturiert werden kann. Alle anderen Bestandteile denaturieren dauerhaft zu einem unspezifischem Konglomerat und werden abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA befindet sich nach der Pelletierung im klaren Lysat. Die Menge und Reinheit der DNA reichte i. Allg. aus, um 2-3 Kontrollen der präparierten DNA durch Restriktionsschnitte durchzuführen

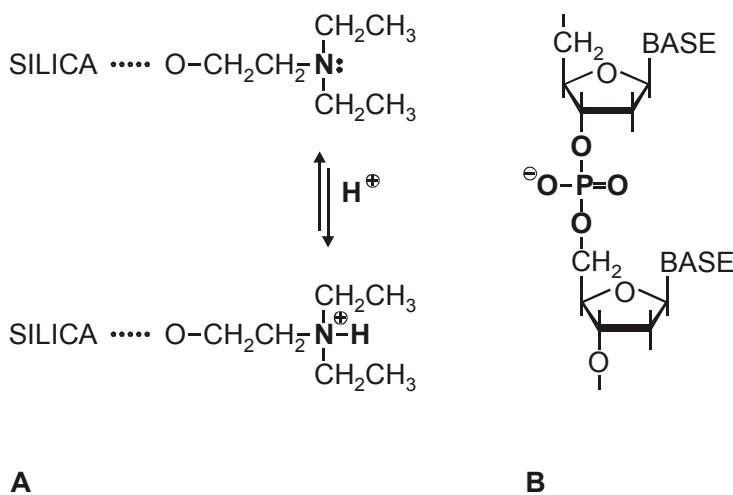
2 ml einer Übernachtskultur wurden in einem Eppendorfgefäß bei 13.000 x g (Tischzentrifuge, Biofuge 13, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) für 30 Sekunden zentrifugiert, das Bakterien-Pellet nach Abgießen des Überstands in 400 µl STET-Lösung (3.3.1.1 A) sorgfältig resuspendiert (Vortex-Genie™ 2, Fa. Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA) und 25 µl Lysozym-Lösung (3.3.1.1 B) zugesetzt. Nach Erhitzen der Bakteriensuspension für 2 min auf 95 °C wurde erneut für 10 min zentrifugiert und der Überstand als klares Lysat in ein zweites Eppendorfgefäß überführt. Mit 400 µl Isopropanol (2-Propanol ≥ 99,7 %; Fa. Roth, Karlsruhe) und 28 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (3.3.1.1 C) gemischt, wurde die Plasmid-DNA durch 15-minütige Zentrifugation pelletiert, mit 500 µl eines 70 %igen Ethanol/Wasser-Gemischs (Ethanol ≥ 99,8 %; Fa. Roth, Karlsruhe) gewaschen und erneut für 15 min zentrifugiert. Nach der Verflüchtigung des Ethanols wurde das Pellet in 30 µl TE-RNase-Puffer (3.3.1.1 E) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.3.2 Säulenpräparation

#### 3.3.2.1 Prinzip und Durchführung der Säulenpräparation

Das Prinzip der Säulenpräparation basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien (BIRNBOIM und DOLY, 1979), auf welche die Adsorption der Plasmid-DNA an eine in Säulen befindliche Anionenaustauscher-Matrix folgt (VOGELSTEIN und GILLESPIE, 1979). Durch Variation der Salz- und pH-Bedingungen können in Waschschritten zunächst niedermolekulare Verunreinigungen sowie RNA und Proteine aus der Säulenmatrix entfernt werden, bevor die Plasmid-DNA eluiert und zur Aufkonzentrierung und Entsalzung mit Isopropanol gefällt wird (Abb. 10).

Je nach erforderlicher Menge der DNA wurde ein QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit bzw. QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Midi, Maxi oder Mega Kit (Fa. QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet, wobei sich die Durchführung der Präparationen nach der detaillierten Herstelleranleitung richtete.



**Abb. 10** Die Plasmidreinigung basiert auf der Wechselwirkung zwischen den negativ geladenen Phosphatresten des DNA-Rückgrats und den positiv geladenen DEAE-Gruppen auf der Oberfläche der Silicapartikel. Teil **A** der Abbildung zeigt die Struktur des DEAE (Diethylamino-ethanol) auf der Oberfläche der Silicapartikel der Säulenmatrix. Teil **B** der Abbildung zeigt einen Ausschnitt der chemischen Struktur der DNA. Salz- und pH-Wert-Bedin-

gungen des jeweiligen Puffers bestimmen die Wechselwirkung der Plasmid-DNA mit dem Resinat (QIAGEN Resin<sup>TM</sup>). Das Resin besteht aus Silicakügelchen mit einem Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$ , an deren Oberflächen DEAE-Gruppen dicht angeordnet sind, um die Bindung der DNA zu ermöglichen. Verunreinigungen wie RNA, Proteine, Kohlenhydrate und niedermolekulare Substanzen werden bei mittlerer Salzkonzentration aus der Säule gewaschen, während die Plasmid-DNA zunächst gebunden bleibt und erst durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration und höherem pH-Wert eluiert wird (QIAGEN<sup>®</sup> Plasmid Purification Handbook).

### **3.4 DNA-Sequenzanalyse und Konservierung einer Bakterienkultur**

Vor jeder Transfektion (3.6) wurde die korrekte Basensequenz für eine Punktmutation (3.1.4) oder ein chimäres Konstrukt (3.1.6) durch partielle Sequenzierung überprüft. Von positiv sequenzierten Klonen wurde zur Konservierung ein Glycerinstock (3.4.3) angelegt.

#### **3.4.1 Durchführung der Sequenzierung**

600 ng der zu untersuchenden Plasmid-DNA wurden mit 20 pmol eines Sequenzier-Primers einer Länge von 18-25 Basen und einer - nach der klassischen „GC-Methode“ ermittelten - Schmelztemperatur von 52-60 °C gemischt als sog. „Hot Shot“ von der Fa. SEQLAB (Sequence Laboratories GmbH, Göttingen) nach dem Acid-Dye-Verfahren sequenziert. In der Regel kam ein Sequenzier-Primer zur Anwendung, der ca. 50-200 Basen vor dem zu untersuchenden DNA-Abschnitt lag, so dass in einer Leseweite von 300 bzw. 500 Basen („Standard“ bzw. „Extended Hot Shot“) das konstruierte Plasmid überprüft werden konnte.

#### **3.4.2 Untersuchung und Bearbeitung der Sequenzen**

Zur Visualisierung und Untersuchung der Basenabfolge wurden die von der Fa. SEQLAB als Sequenzierungs-Dateien gelieferten Sequenzen mit dem Programm „Chromas“ (Version 1.51; Fa. Technelysium Pty Ltd.) dargestellt. Updates und aktuelle Versionen der Software finden sich unter: <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>. Eine so verifizierte DNA-Sequenz war Grundlage zur Planung und Kontrolle von Punktmutationen (3.1.4) und chimären Konstrukten (3.1.6) bzw. Ausgangspunkt für die Suche nach Restriktionsschnittstellen durch das Programm „Silmut“ (SHANKARAPPA et al., 1992a und 1992b).

#### **3.4.3 Kryokonservierung eines Bakterienklons**

Zur Konservierung eines positiv sequenzierten Bakterienklons wurden 1,5 ml einer dicht bewachsenen Übernachtskultur mit 0,3 ml autoklaviertem Glycerin (Glycerol, wasserfrei, reinst; Fa. Merck, Darmstadt) in einem sterilem Einfrier-Röhrchen (Sorenson<sup>TM</sup> Multi Twist Top Skirted Vial; Fa. Bioscience Inc., Heidelberg) sorgfältig gemischt, in flüssigem Stickstoff (-196 °C) für ca. 10 Sekunden schockgefroren und bei -70 °C gelagert (Glycerinstock; SAMBROOK et al., 1989). Um die Bakterienkultur zu reaktivieren, wurde ein Aliquot des Glycerinstocks mit Hilfe einer sterilen Impföse auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin

(3.2.1 H) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert (Begasungsbrutschrank BB6220; Fa. Heraeus Instruments, Hanau).

### 3.5 Kultivierung und Konservierung von COS1-Zellen

#### 3.5.1 Lösungen und Medien

##### A) Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (20.000 IE/ml bzw. 20.000 µg/ml)

1,2 g Penicillin G - Natriumsalz (Fa. Biochrom AG, Berlin) wurden mit 2,0 g Streptomycin-sulfat (Fa. Biochrom AG, Berlin) in 100 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9 % (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) gelöst und bei -20 °C gelagert.

##### B) DMEM (Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium) + FKS (Fötales Kälberserum) 10 %

13,5 g DMEM-Trockenmedium (Fa. Biochrom AG, Berlin) und 2,2 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 5 ml einer Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (3.5.1 A) in 900 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf einen pH-Wert von 7,15 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 ml ergänzt. Nach Sterilfiltration der Lösung unter Verwendung eines Edelstahl-Vakuum-Filtrationsgeräts (Nr. SM 16268 107500; Fa. Sartorius, Göttingen) mit Vor- und Hauptfilter (0,2 µm; beides Fa. Sartorius, Göttingen) wurde die Lösung bei 4 °C bis zu 8 Wochen gelagert.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde 100 ml sterilfiltriertes und für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviertes Fötales Kälberserum (FKS; Kraeber GmbH & Co, Ellerbek) zugegeben und das fertige Medium im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

##### C) Einfriermedium (DMEM + FKS 20%)

12 ml DMEM (3.5.1 B) wurde unter der Reinraumwerkbank mit 3 ml FKS (3.5.1 B) versetzt.

##### D) DMSO-Lösung (Einfriermedium + DMSO 20%)

12 ml Einfriermedium (3.5.1 C) wurde unter der Reinraumwerkbank mit 3 ml autoklaviertem Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) versetzt.

##### E) Trypsin/EDTA-Lösung

100 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 % / 0,2 % in Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem *Phosphate Buffered Saline* „10 x PBS“; Fa. Biochrome AG, Berlin) wurden mit bidestilliertem,

autoklaviertem Wasser zu einem Endvolumen von 1000 ml gemischt, aliquotiert und bei -20 °C bis zu einem Jahr gelagert.

*F) CMF-PBS (Phosphatpuffer)*

8,0 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 0,2 g Kaliumchlorid (KCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 1,15 g wasserfreiem Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) in 900 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt, auf ein Endvolumen von 1000 ml mit bidestilliertem Wasser ergänzt und autoklaviert.

### **3.5.2 Kultivierung und Passagieren von COS1-Zellen**

COS1-Zellen (CV-1, Origin of SV40; GLUZMAN, 1981) sind Derivate einer permanenten Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (CV-1), die mit einem „origin-defective“ Simian Virus (SV40) infiziert sind. Nach einer Transfektion (3.6) in COS1-Zellen kann die cDNA der Zielproteine in Plasmiden, die das SV40 - „origin of replication“ besitzen, wie z.B. pECE- und pCMV6c-Vektoren transient autonom repliziert werden.

Die als Monolayer wachsenden Zellen wurden bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  in DMEM mit 10 % FKS (3.5.1 B) kultiviert (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) und im Abstand von 3 bis 4 Tagen passagiert. Dazu wurden die COS1-Zellen in Petrischalen (92 mm Durchmesser; Fa. Sarstedt, Nümbrecht) nach dem Absaugen des Kulturmediums zweimal mit 8 ml CMF-PBS (3.5.1 F) gespült, mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (3.5.1 E) versetzt und für 2-5 min im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 6 ml frischen Kulturmediums (3.5.1 B) und leichtes Aufschlagen der Petrischalen auf die Tischplatte der Reinraumwerkbank wurde das Abdauen der Zellen gestoppt und die noch am Boden der Schale haftenden Zellen abgelöst. Die gesamte Zellsuspension jeweils einer Petrischale wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 4 °C und 100 x g für 5 min sedimentiert (Heraeus Megafuge 1.OR, Rotor 2705, 900 Upm; Fa. Heraeus Instruments, Hanau). Nach dem Absaugen des Überstands und Bestimmung der Zellzahl wurden die Sedimente in jeweils 10 ml Kulturmedium (3.5.1. B) resuspendiert und im Verhältnis von 1:3 bis 1:5 so auf frische Petrischalen umgesetzt, dass sich eine Zelldichte von ca. 500.000 Zellen pro Schale ergab.



### 3.5.3 Konservierung von COS1-Zellen

Zur Konservierung wurden abgedaute und sedimentierte Zellen einer dicht bewachsenen Kulturschale (3.5.2) in 1,5 ml auf 4 °C vorgekühltem Einfriermedium (3.5.1 C) resuspendiert und mit 1,5 ml auf 4 °C gekühlter DMSO-Lösung (3.5.1. D) versetzt. Jeweils 1,5 ml dieser Suspension wurden in ein autoklaviertes Einfrier-Röhrchen (Mikro-Röhren für Kryoanwendungen; Fa. Sarstedt Nümbrecht) pipettiert und in einer mit Isopropanol (2-Propanol 100%; Fa. Fluka, Neu-Ulm) gefüllten Einfrierbox (Mr. Frosty; Fa. Nunc GmbH, Wiesbaden) für ca. 4-5 Stunden bei -70 °C gekühlt. Diese Einfriermethode ermöglicht eine schonende und gleichmäßige Abkühlung der Zellsuspension mit ca. 1 °C pro min. Anschließend wurden die Röhrchen aus dem Einfriergefäß entnommen und tiefgefroren in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

## 3.6 Transfektion

Eine Transfektion (Transfer von z.B. Plasmid-DNA in Säugetier-Zellen) ermöglicht die Reduplikation der in die Plasmidvektoren eingebrachten DNA-Fragmente und Expression der Zielproteine wie z.B. des SUR durch Kultivierung einer transfizierten Zelllinie.

### 3.6.1 Lösungen und Medien

#### *A) DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran-Stammlösung 50 mg/ml)*

500 mg Diethylaminoethyl-Dextran (DEAE-Dextran; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert.

#### *B) TBS-Puffer (Tris Buffered Saline)*

Lösung A: 80 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 3,8 g Kaliumchlorid (KCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 2,0 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, wasserfrei, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 30 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) in 900 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert. Lösung B: 1,5 g Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 1,0 g Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert. Nach Verdünnen von 100 ml der

Lösung A mit 890 ml bidestilliertem Wasser wurde unter Rühren langsam 10 ml der Lösung B dazugegeben, der fertige TBS-Puffer sterilfiltriert (3.5.1 B) und bei 4 °C gelagert.

*C) HBSS-Puffer (Hepes Buffered Saline Solution)*

8,0 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 0,37 g Kaliumchlorid (KCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 2,0 g Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , wasserfrei, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 5,0 g 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure (HEPES; Fa. Boehringer, Mannheim) in 900 ml bidestilliertem Wasser gelöst, mit 1 N NaOH auf pH 7,05 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1000 ml ergänzt, sterilfiltriert (3.5.1 B) und bei 4 °C gelagert.

*D) FKS (10 %) in TBS*

Zum sofortigen Gebrauch wurden 36 ml TBS-Puffer (3.6.1 B) mit 4 ml hitzeinaktiviertem und sterilfiltriertem (3.5.1 B) fötalen Kälberserum (FKS; Kraeber GmbH & Co, Ellerbek) unter der Reinraumwerkbank gemischt.

*E) DMSO (10 %) in HBSS*

Zum sofortigem Gebrauch wurden 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) mit 45 ml HBSS-Puffer (3.6.1 C) unter der Reinraumwerkbank gemischt.

*F) NaCl-Lösung (Natriumchloridlösung 5 M)*

2,92 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst mit HCl 37% (p.a.; Fa. Roth, Karlsruhe) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 300 ml aufgefüllt und autoklaviert.

*G) Chloroquin-Stammlösung*

51,6 mg Chloroquin (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden mit 0,5 ml 1 M Trispuffer pH 7,4 (3.1.1 E) und 0,28 ml 5 M Natriumchloridlösung (3.6.1 F) in 9,22 ml bidestilliertem Wasser gelöst, sterilfiltriert (3.2.1 A) und aliquotiert bei -20 °C und vor Licht geschützt gelagert.

#### *H) DMEM-Chloroquin-FKS-Medium*

2 ml hitzeinaktiviertes, sterilfiltriertes (3.5.1 B) Fötale Kälberserum (FKS; Kraeber GmbH & Co, Ellerbek) und 1 ml Chloroquin-Stammlösung (3.6.1 G) werden zum sofortigen Gebrauch mit 97 ml DMEM-Medium ohne FKS (3.5.1 B) unter der Reinraumwerkbank gemischt.

### **3.6.2 Durchführung einer Transfektion (DEAE-Dextran-Methode)**

Die DEAE-Dextran-Methode einer Transfektion nutzt die Eigenschaft des Polykations DEAE-Dextran, DNA zu komplexieren und an der Zelloberfläche zu adsorbieren. Die gebildeten DNA-DEAE-Dextran-Präzipitate können so in Endosomen eingeschlossen durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden (LOPATA et al., 1984).

Die transiente Transfektion wurde in einer Modifikation der klassischen DEAE-Dextran-Methode durchgeführt. 24 Stunden vor dem Zeitpunkt der Transfektion wurden ca. 500.000 COS1-Zellen (3.5.2) in Petrischalen mit einem Durchmesser von 92 mm (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) ausgesät und in 12 ml Kulturmedium (3.5.1 B) im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB6220; Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am folgenden Tag wurden 20 µg des Plasmids mit 83,6 µl DEAE-Dextran (3.6.1 A) und TBS-Puffer (3.6.1 B) zu 180 µl ergänzt, sorgfältig gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur komplexiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit je 8 ml HBSS-Puffer (3.6.1 C) wurde das Copräzipitat aus DNA und DEAE-Dextran mit 4 ml FKS (10%) in TBS (3.6.1 D) vorsichtig gemischt, auf die vorbereiteten COS1-Zellen pipettiert und nach vorsichtigem Schwenken für weitere 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurden 5 ml einer auf 37 °C vortemperierten Lösung von DMSO (10 %) in HBSS (3.6.1 E) genau für 2 min auf die COS-Zellen appliziert und erneut abgesaugt, bevor die Zellen in 10 ml eines ebenfalls auf 37 °C vorgewärmten DMEM-Chloroquin-FKS-Mediums (3.6.1 H) für weitere 4 Stunden inkubiert wurden (LUTHMAN und MAGNUSSON, 1983). Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit je 8 ml HBSS-Puffer (3.6.1 C) gewaschen und 12 ml Kulturmedium (3.5.1 B) zugesetzt. Nach 72 Stunden konnten die Zellen für Membranpräparationen verwendet werden.

### **3.6.3 Histologische LacZ - Färbung**

Zur Kontrolle der durchgeführten Transfektionen wurde eine histologische LacZ - Färbung durchgeführt. Dazu wurde zusätzlich zu jeder Transfektion (3.6.2) parallel ein Plasmid

transfiziert, dessen Gensequenz für die  $\beta$ -Galactosidase kodiert ( $\beta$ -Gal-cDNA / pcDNA3; Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Dieses Enzym kann den farblosen Farbstoff X-Gal zu einem blauen Produkt umsetzen und fungiert somit als Indikator für die Effizienz der Transfektion und Proteinexpression.

### 3.6.3.1 Lösungen

#### A) X-Gal (10 mg/ml)

500 mg 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden unter dem Abzug in 50 ml N,N-Dimethylformamid (N,N-DMF, zur Synthese.; Fa. Roth, Karlsruhe) gelöst und vor Licht geschützt bei -20 °C gelagert.

#### B) Magnesiumchlorid-Lösung (2 M)

40,66 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

#### C) Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung (0,5 M)

1056 mg Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

#### D) Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (0,5 M)

823 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ; Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden in 5 ml bidestilliertem Wasser gelöst und vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

#### E) Triton<sup>®</sup> X-100 (0,2%) in CMF-PBS

200  $\mu\text{l}$  Triton<sup>®</sup> X-100 (Fa. Boehringer, Mannheim) wurden in CMF-PBS (3.5.1 F) auf ein Gesamtvolumen von 100 ml gelöst.

#### F) Paraformaldehyd (3%) in CMF-PBS

Unter dem Abzug wurden 30 g Paraformaldehyd (reinst; Fa. Merck, Darmstadt) in 900 ml auf 60 °C vorgewärmten CMF-PBS-Puffer (3.5.1 F) durch Rühren gelöst und mit 10 N NaOH auf

einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach Ergänzen mit CMF-PBS auf ein Endvolumen von 1000 ml wurde die Lösung filtriert und tiefgekühlt in Aliquoten bei -20 °C gelagert.

#### *G) Färbelösung*

Zum sofortigen Gebrauch wurden 100 µl 0,5 M Kaliumhexacyanoferrat(II)-Lösung (3.6.3.1 C) und 100 µl 0,5 M Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung (3.6.3.1 D) mit 1 ml X-Gal (3.6.3.1 A) und 10 µl 2 M Magnesiumchlorid-Lösung (3.6.3.1 B) auf ein Endvolumen von 10 ml in bidestilliertem Wasser gelöst.

### **3.6.3.2 Durchführung und Auswertung der LacZ - Färbung**

Nach Transfektion (3.6.2) des  $\beta$ -Galactosidase-Plasmids (3.6.3) in COS1-Zellen (3.5) und Inkubation im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB6220, Fa. Heraeus Instruments, Hanau) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 Stunden, wurden die Zellen zweimal mit CMF-PBS (3.5.1 F) gewaschen und mit 5 ml einer 3 %igen Paraformaldehyd-Lösung im CMF-PBS (3.6.3.1 F) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurden die Zellen zunächst zweimal mit CMF-PBS (3.5.1 F) gewaschen und für 10 min mit 5 ml 0,2 % Triton<sup>®</sup> X-100 behandelt, bevor die Zellen viermal erneut mit CMF-PBS (3.5.1 F) gewaschen und mit 10 ml der Färbelösung (3.6.3.1 G) für 24 Stunden inkubiert wurden. Am nächsten Tag erfolgte unter dem Mikroskop die Bestimmung der Transfektionseffizienz.

Transfizierte Zellen erscheinen durch Expression der  $\beta$ -Galactosidase und Umsatz des farblosen Farbstoffes X-Gal blau. Der prozentuale Anteil blau gefärbter Zellen an der Gesamtmenge der ausgezählten Zellen bestimmt die Transfektionsdichte.

## **3.7 Membranpräparation**

### **3.7.1 Lösungen und Medien**

#### *A) Phosphat-Spülpuffer*

12 g Natriumchlorid (NaCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt), 300 mg Kaliumchlorid (KCl, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 1725 mg Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 150 mg Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) und 150 mg Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>, p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 mit

1 N HCl wurde der Puffer mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 1500 ml aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

*B) Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 100 mM)*

8,71 mg Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden in 500 µl Ethanol (Ethanol  $\geq$  99,8 %; Fa. Roth, Karlsruhe) gelöst.

*C) Lyse-Medium (pH 8,0)*

60,5 mg 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden mit 100 µl 100 mM PMSF-Lösung (3.7.1 B) in 90 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 8,0 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

*D) Homogenisations-Medium (pH 7,4)*

303 mg 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden mit 50 µl 100 mM PMSF-Lösung (3.7.1 B) in 40 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt.

*E) Tris-Puffer (5 mM, pH 7,4)*

60,5 mg 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden in 90 ml bidestilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 eingestellt und mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

### **3.7.2 Durchführung der Membranpräparation aus COS1-Zellen**

Nach einer 72-stündigen Inkubation der transfizierten COS-Zellen (3.6) und Absaugen des Kulturmediums (3.5.1 B) aus den Petrischalen, wurde der Zellrasen zunächst mit 5 ml Phosphat-Puffer (3.7.1 A) gewaschen und mit einer Gummilippe und weiteren 3 ml des Puffers vom Boden der Kulturschalen abgelöst. Diese Zellsuspension wurde in ein Zentrifugen-Röhrchen mit spitzem Boden überführt und die Kulturschalen zweimal mit 2 ml Phosphat-Puffer (3.7.1 A) nachgespült. Nach einer Zentrifugation der Suspension für 5 min bei 100 x g (Heraeus Megafuge 1.OR, Rotor 2705, 900 Upm; Fa. Heraeus Instruments, Hanau) wurde das Sediment in jeweils 500 µl vorgekühltem Lyse-Medium (3.7.1 C) resuspendiert und in einen

Glashomogenisator (Fa. Kontes Glass Company, Vineland, NJ, USA) überführt. Innerhalb einer 30-minütigen Inkubation der Suspension auf Eis, wurden die Zellen durch das hypotone Lyse-Medium (3.7.1 C) osmotisch zerstört, bevor die Zellfragmente unter Kühlung in 40 Hüben mit einem Teflonpistill bei 500 Upm mechanisch homogenisiert wurden. Nach erneuter Zentrifugation der Zell-Bruchstücke bei 4 °C und 38.000 x g für 30 min (Kühlzentrifuge GR 2022, Rotor AG 2.20, 20.000 Upm; Fa. Jouan GmbH, Unterhaching) und Resuspendierung in jeweils 100 µl kaltem Homogenisations-Medium (3.7.1 D) folgte ein weiterer Zentrifugations-schritt für 1 Stunde bei 4 °C und 38.000 x g. Dieses Sediment - im folgenden als Membranen bezeichnet - wurde in jeweils 250 µl kaltem 5 mM Tris-Puffer (3.7.1 E) resuspendiert und nach erneuter Homogenisierung aliquotiert bei -70 °C gelagert.

### **3.8 Bindungsexperimente an COS1-Membranen**

#### **3.8.1 Puffer für Bindungsexperimente**

##### *A) Standardpuffer I (Tris-Puffer, 50 mM, pH 7,4)*

60,55 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden in 9,5 l bidestilliertem Wasser gelöst, mit HCl 37% (p.a.; Fa. Roth, Karlsruhe) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 10,0 l aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

##### *B) Standardpuffer II (Tris-Puffer, 200 mM, pH 7,4)*

121,1 g 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris; Fa. Roth, Karlsruhe) wurden in 4,5 l bidestilliertem Wasser gelöst, mit HCl 37% (p.a.; Fa. Roth, Karlsruhe) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt, mit bidestilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 5,0 l aufgefüllt und bei 4 °C gelagert.

#### **3.8.2 Stammlösungen**

Aus den folgenden Stammlösungen wurde durch stufenweise Verdünnung mit Standardpuffer I (3.8.1 A) bzw. Standardpuffer II (3.8.1 B) die im Bindungsexperiment jeweils benötigte Konzentration der Lösungen hergestellt.

*A) Glibenclamid-Stammlösung (1 mM)*

4,94 mg Glibenclamid (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurden bei 37 °C in 10 ml 50 mM NaOH unter Rühren über Nacht gelöst und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

*B) Pinacidil-Stammlösung (20 mM)*

5,26 mg Pinacidil (Fa. Leo GmbH Pharmazeutische Produkte, Dreieich) wurden in 25 ml 25 mM HCl gelöst und vor Licht geschützt zu Aliquoten bei -20 °C gelagert.

*C) Diazoxid-Stammlösung (10mM)*

44,75 mg Diazoxid (Fa. Essex Pharma GmbH, München) wurden in 20 ml 40 mM NaOH gelöst und zu Aliquoten bei -20 °C gelagert.

*D) Magnesiumchlorid in Standardpuffer I (50 mM)*

1,02 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , p.a.; Fa. Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml Standardpuffer I (3.8.1 A) gelöst und bei 4 °C gelagert.

*E) MgATP-Lösung (25 mM)*

Zum sofortigen Gebrauch wurden 30,26 mg Adenosintriphosphat-Trihydrat ( $\text{ATP} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ; Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in 1000  $\mu\text{l}$  50 mM Magnesiumchlorid-Lösung (3.8.2 D) und 1000  $\mu\text{l}$  Standardpuffer I (3.8.1 A) gelöst.

### **3.8.3 Lösungen der Radioliganden**

*A) [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid–Stammlösung (3 nM; 51,4 Ci / mmol)*

4  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (250  $\mu\text{Ci}$  / 250  $\mu\text{l}$ ; Fa. DuPont NEN Products, Boston, USA) wurden mit 40 ml Standardpuffer I (3.8.1 A) gemischt. Die Konzentration an [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid wurde durch Flüssigkeits-Szintillationszählung kontrolliert und korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (33840 dpm / 100  $\mu\text{l}$ ) größer als 5 % war.

*B) [ $^3\text{H}$ ]P1075-Stammlösung (30 nM; 121 Ci / mmol)*

360  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ]P1075 (250  $\mu\text{Ci}$  / 5000  $\mu\text{l}$ ; Fa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) wurden mit 4640  $\mu\text{l}$  Standardpuffer I (3.8.1 A) gemischt. Die Konzentration an [ $^3\text{H}$ ]P1075 wurde durch Flüssigkeits-Szintillationszählung kontrolliert und korrigiert, wenn die Abweichung vom Sollwert (79920 dpm / 10  $\mu\text{l}$ ) größer als 5 % war.



### 3.8.4 Vorbereitung der Membranen

Aliquote der bei -70 °C gelagerten Membranen (3.7.2) wurden bei 4 °C aufgetaut und in Standardpuffer I (3.8.1 A) resuspendiert. Die verdünnte Membransuspension wurde in einem 20 ml Polystyrol-Mehrzweckgefäß (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) 8-10 mal für jeweils ca. eine Sekunde mit einem Ultraschallaufschlussgerät unter Eiskühlung extern beschallt (Sonifier B-12 mit Standard-Resonator, output control: Stufe 7, duty cycle 25 %, nicht gepulst; Fa. Branson Sonic Power Company, Danbury, USA). Die Verdünnung der Membransuspension wurde in Abhängigkeit von der Expressionsdichte der Zielproteine (SUR-Isoformen, Punktmutationen und Chimären) über die Maximal-Bindung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid bzw. [<sup>3</sup>H]P1075 in Anwesenheit von 10 mM MgATP (3.8.2 E) definiert.

### 3.8.5 Gleichgewichtsbindungsexperimente

#### 3.8.5.1 *Prinzip des Gleichgewichtsbindungsexperiments und Filtrationsassays*

Ziel eines Gleichgewichtsbindungsexperiments ist die Untersuchung der Wechselbeziehung zwischen Rezeptoren und Liganden (Rezeptor-Ligand-Bindungsstudie). Radioliganden (3.8.3) und nicht-markierte Liganden (3.8.2 A bis C) werden mit vorbereiteten Membranen (3.8.4) bis zur Einstellung eines Reaktionsgleichgewichtes inkubiert. Die Beendigung der Bindungsreaktion erfolgt durch die Trennung der an den Rezeptor gebundenen Radioliganden von den im Inkubationsmedium verbleibenden freien Radioliganden. Eine dafür übliche Methode ist die Zentrifugation oder Filtration (REPKE und LIEBMANN, 1987). Die Bestimmung der emittierten  $\beta$ -Strahlung der am Rezeptor gebundenen Radioliganden erlaubt die Charakterisierung von Pharmaka und Rezeptorkonstrukten, Ermittlung von Affinitäten diverser Liganden sowie eine Quantifizierung der Rezeptor-Bindungsstellen. Ein schnelles und effektives Verfahren zur Trennung von freien und gebundenen Liganden bei Radioligandbindungsstudien ist die Vakuumfiltration (BENNETT, 1978). Da der Radioligand-Rezeptor-Komplex während der Filtration jedoch einem radioligandfreien Waschpuffer ausgesetzt ist, wird dieses Verfahren nur für Ligand-Rezeptor-Komplexe empfohlen, deren Dissoziationskonstanten im unteren nanomolaren Bereich liegen (REPKE und LIEBMANN, 1987).

### 3.8.5.2 Durchführung der Bindungsstudien

Die Inkubationen wurden standardisiert in 1,5 ml- und 2,0 ml-Reagiergefäßen ohne Deckel bzw. 20 ml Polystyrol-Mehrzweckgefäßen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) bei Raumtemperatur durchgeführt und enthielten im Reaktionsansatz neben Radioliganden definierter Molaritäten (3.8.3), Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (3.8.2) und Standardpuffer (3.8.1). Wenn nicht abweichend angegeben, wurden alle Inkubation durch Zugabe von mikrosomalem Protein (Membranen, 3.8.4) gestartet und nach 60 min durch Filtration beendet.

#### A) Bindung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid

Das Inkubationsmedium enthielt [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (3.8.3 A) in einer Endkonzentration von 0,3 nM, Standardpuffer I (3.8.1 A) und mikrosomales Membranprotein (3.8.4). Durch parallele Inkubation von Ansätzen, die neben [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid zusätzlich einen Überschuss nicht-markiertes Glibenclamid (100 nM, 3.8.2 A) enthielten, konnte die unspezifische Bindung bestimmt werden. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung bestimmt.

#### B) Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075

Das Inkubationsmedium enthielt [ $^3\text{H}$ ]P1075 (3.8.3 B) in einer Endkonzentration von 3 nM, Standardpuffer II (3.8.1 B), mikrosomales Membranprotein (3.8.4), MgATP-Lösungen (3.8.2 E) unterschiedlicher Molaritäten sowie freies Magnesiumchlorid (3.8.2 D). Durch parallele Inkubation von Ansätzen, die neben [ $^3\text{H}$ ]P1075 zusätzlich einen Überschuss nicht-markiertes Pinacidil (100  $\mu\text{M}$ , 3.8.2 B) enthielten, konnte die unspezifische Bindung bestimmt werden. Die spezifische Bindung wurde durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung bestimmt.

#### 3.8.5.2.1 Verdrängungsexperimente

[ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (3.8.3 A) bzw. [ $^3\text{H}$ ]P1075 (3.8.3 B) in Endkonzentrationen von 0,3 nM bzw. 3 nM wurden durch nicht-markiertes Glibenclamid oder nicht-markiertes Pinacidil aus der Bindung verdrängt. Die jeweiligen Endkonzentrationen im Inkubationsansatz und weitere Parameter sind im Ergebnisteil angegeben und wurden durch Zugabe von Aliquoten und Verdünnungen der Stammlösungen (3.8.2) eingestellt.

#### 3.8.5.2.2 Dissoziationsexperimente

Zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichts wurden vorbereitete Membranen (3.8.4) in Standardpuffer (3.8.1) mit 0,3 nM [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (3.8.3 A) bzw. 3 nM [ $^3\text{H}$ ]P1075 (3.8.3 B) in 20 ml Polystyrol-Mehrzweckgefäßen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) für 60 min vorinkubiert. Die Konzentrationen weiterer Substanzen und Lösungen im Inkubationsansatz sind im Ergebnisteil angegeben und wurden durch Zugabe von Aliquoten und Verdünnungen der Stammlösungen (3.8.2) eingestellt. Durch Zusatz von nicht-markiertem Glibenclamid bzw. nicht-markiertem Pinacidil oder der Kombination beider Substanzen zum Startzeitpunkt wurde die Dissoziationsreaktion begonnen, in definierten Zeitintervallen ein Aliquot entnommen und die Bindungsreaktion wie beschrieben (s. 3.8.5.2.3) mit Hilfe eines Filtrationsassays beendet.

#### 3.8.5.2.3 Durchführung der Filtration und Szintillationszählung

Freie und am Rezeptor gebundene Liganden des Inkubationsansatzes wurden über Vakuumfiltration durch ein Glasfaserfilter getrennt.

Die Filtrationsapparatur, bestehend aus einer Saugflasche (2000 ml, Duran<sup>®</sup> Glas vakuumfest; Fa. Schott Geräte GmbH, Mainz) mit einem Membranfilteraufsatz, war an eine Vakuumpumpe (Membranpumpe mit Druckregler; Fa. Vaccubrand, Wertheim) angeschlossen. Das Inkubationsgemisch eines Ansatzes oder eines Aliquots wurde auf ein Glasfaserfilter (Whatman Filter GF/B, Durchmesser 25 mm; Fa. Whatman International Ltd., Maidstone, UK) pipettiert, das vor Verwendung in auf 4 °C gekühlten Standardpuffer I (3.8.1 A) eingelegt wurde. Das Filter wurde anschließend dreimal mit gekühltem Standardpuffer I gespült, nach dem Spülvorgang in ein Zählgefäß (Mini Vial C; Fa. Roth, Karlsruhe) überführt und mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumasafe<sup>TM</sup> Plus, Fa. Lumac; LSC B.V, Groningen, NL) versehen. Nach Äquilibration für 24 Stunden bei Raumtemperatur konnte der [ $^3\text{H}$ ]-Gehalt des Filters in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (Tri-Carb 2100 TR; Fa. Canberra Packard Central Europe GmbH, Schwadorf, A) ermittelt werden.

### 3.9 Datenbanksuche und Sequenzvergleich

Zur Untersuchung von Sequenzmotiven bzw. Charakterisierung funktionell kritischer Aminosäuren des SUR wurden Homologiesuchen durchgeführt (PEARSON und LIPMAN, 1988). Dabei wird die Ähnlichkeit von gesuchter und Ausgangs-Proteinsequenz nach mathematischen Algorithmen bestimmt. Anhand diverser Parameter wie z.B. bit-score, p-value und e-value

(ALTSCHUL et al., 1990a; 1990b) wurden erste Rückschlüsse auf den Grad der Übereinstimmung der Proteine bzw. einzelner Sequenzen gezogen.

Mit Hilfe des ClustalX (1.81; HIGGINS und SHARP, 1988; THOMPSON et al., 1997) und der in der Proteinbank der National Institutes of Health (NIH, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) vorhandenen Sequenzen wurde ein Alignment oder Multiple Alignment für multiple Vergleiche nach der Cluster-Methode durchgeführt. Neueste Versionen des ClustalX für Windows finden sich laufend aktualisiert unter: <ftp://ftp.embl-heidelberg.de> bzw. [www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo](http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo) .

### **3.10 Homologiemodell**

Sequenz-Details und biologische sowie strukturelle Daten der Proteinbank (PDB) des Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB; BERMAN et al., 2000; <http://www.rcsb.org/pdb>) waren Grundlage für die Modell-Strukturen der NBFs des SUR, die in enger Zusammenarbeit mit Dr. H.J. HECHT (Abteilung für Strukturbioogie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig) entwickelt wurden. Basis für die Strukturmodelle der NBFs des SUR war die hochauflösende Kristallstruktur einer Untereinheit des humanen Antigen Peptid Transporters (TAP1; GAUDET und WILEY, 2001).

Für den Vergleich der Aminosäuresequenzen wurde das Programm BRAGI (SCHOMBURG und REICHELT, 1988) und zur Berechnung der Analogmodelle das „program O“ (JONES, 1985) verwendet. Für die Bildgebung der Strukturen kam die Anwendung MolScript v2.1.2 (KRAULIS, 1991; <http://www.avatar.se/molscript>) zum Einsatz, bevor die Analogmodelle schließlich mit gl\_render (ESSER L., unveröffentlicht) und POV-Ray<sup>TM</sup> (<http://www.povray.org>) dargestellt werden konnten.

### **3.11 Datenauswertung**

Die Approximation der Kurven gemäß der beschriebenen Formeln erfolgte unter Verwendung des Programms SigmaPlot 2000 für Windows, Version 6.0 (SPSS Science Software GmbH, Erkrath).

#### **3.11.1 Statistik**

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) für N unabhängige Einzelerperimente angegeben. Signifikanzen wurden unter

Verwendung des zweiseitigen U-Tests nach WILCOXON, MANN UND WHITNEY für multiple Vergleiche errechnet (WALLENSTEIN et al., 1980). Die jeweiligen Signifikanzen sind im Ergebnisteil vermerkt.

### 3.11.2 Gleichgewichtsbindungen

Zur Analyse der Beziehung zwischen Substanzkonzentration und Bindung wurde unter der Voraussetzung einer monophasischen Ligand-Rezeptor-Interaktion folgende Funktion (2) verwendet:

$$(2) \quad B = \frac{100 - k}{1 + \left( \frac{EC_{50}}{[A]} \right)^n} + k$$

B ist die spezifische Bindung, [A] die freie Substanzkonzentration,  $EC_{50}$  die halbmaximal-effektive Konzentration, n der Steigungsparameter (Hill-Koeffizient) und k eine additive Konstante.

### 3.11.3 Dissoziationskonstanten

Die Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) für die Bindung an den Sulfonylharnstoffrezeptor wurden mittels der Cheng-Prusoff-Korrektur aus den halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen ( $IC_{50}$ -Werte) unter Verwendung folgender Beziehung (3) berechnet (CHENG und PRUSOFF, 1973):

$$(3) \quad K_D = \frac{IC_{50}}{1 + \left( \frac{[A_R]}{K_{D(R)}} \right)}$$

$K_D$  ist die Dissoziationskonstante der verdrängenden Substanz,  $[A_R]$  die Konzentration und  $K_{D(R)}$  die Dissoziationskonstante des Radioliganden.

### 3.11.4 Dissoziationskinetiken

#### A) Monophasische Dissoziation

Die Analyse der Dissoziationskinetiken mit monophasischem Verlauf wurden unter Verwendung folgender Funktion (4) analysiert:

$$(4) \quad B = 100 \cdot e^{(-kt)}$$

B ist die Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden zum Zeitpunkt t, k ist die Geschwindigkeitskonstante und t ist die Zeit.

#### B) Biphasische Dissoziation

Dissoziationen mit biphasischem Verlauf wurden unter der Verwendung folgender Funktion (5) analysiert:

$$(5) \quad B = B_1 \cdot e^{(-k_1t)} + B_2 \cdot e^{(-k_2t)}$$

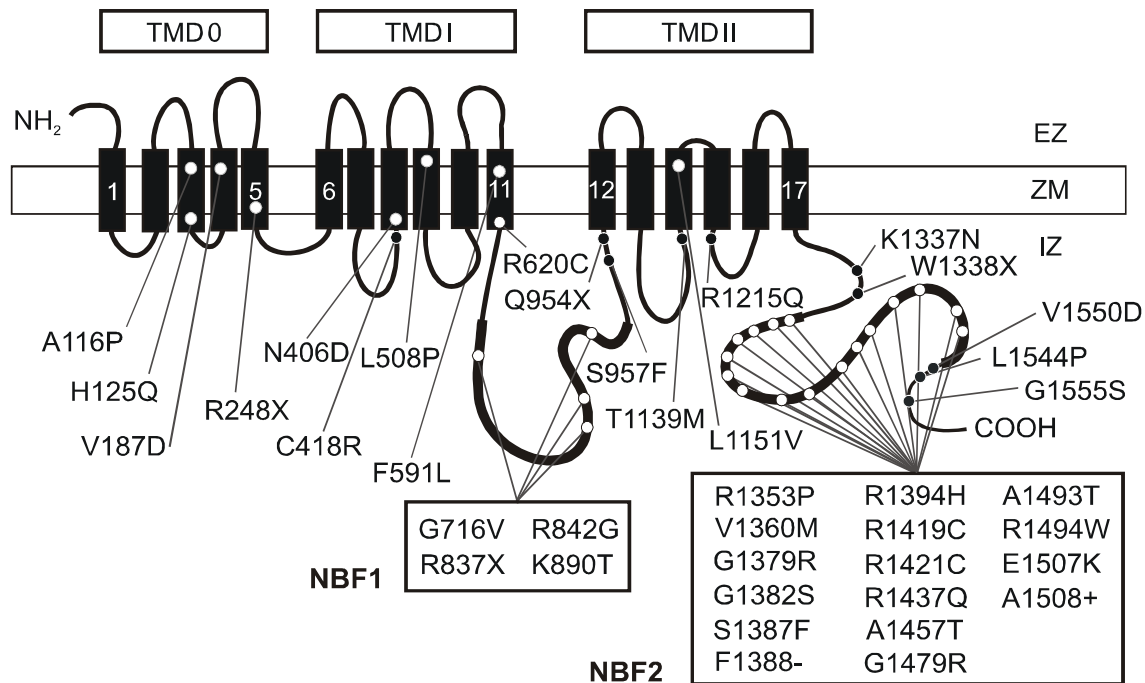
B ist die Gesamtmenge des spezifisch gebundenen Liganden zum Zeitpunkt t,  $B_1$  und  $B_2$  sind die zum Zeitpunkt  $t = 0$  min auf die beiden Komponenten entfallenden Anteile der Bindung,  $k_1$  und  $k_2$  die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten und t ist die Zeit.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 3D-Struktur von NBF1 und NBF2 des SUR2A

#### 4.1.1 Einführung

Zahlreiche Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in SUR1 sind ursächlich für den Hyperinsulinismus des Kleinkindalters (HI; hyperinsulinism in infancy) - einer lebensbedrohlichen Erkrankung mit Insulinhypersekretion trotz hypoglykämischer Stoffwechsellaage (s.a. 1.1). Diese Mutationen befinden sich im gesamten SUR (Abb. 11). Auffällig ist, dass sich die HI-induzierenden Mutationen mit einer hohen Frequenz vor allem in NBF2 häufen und nur sehr wenige Mutationen in NBF1 lokalisiert sind. Insgesamt sind bislang über 80 Mutationen in SUR1 bekannt, die mit HI assoziiert sind - mehr als 60 % davon finden sich in NBF2 (FOURNET und JUNIEN, 2003).



**Abb. 11** Lokalisierung von HI-Mutationen in SUR1. HI-assozierte Substitutionen, Deletionen und Insertionen sind im transmembranären Topologie-Modell des SUR1 nach TUSNADY et al., 1997 und CONTI et al., 2001 dargestellt. Polymorphismen und Mutationen, die zu Leseraster-Verschiebungen führen, sind nicht aufgeführt (Abb. in Anlehnung an TAWAKKOL, 2001; TMD = Transmembranäre Domäne, EZ = extrazellulär, ZM = Zellmembran, IZ = intrazellulär).

Um der Ursache für die Häufung der Mutationen in NBF2 nachzugehen, wurden sowohl hochkonservierte, als auch HI-analoge Aminosäuren in NBF2 und NBF1 substituiert und die funktionellen Auswirkungen über die Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch MgATP und die Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch nicht markiertes Pinacidil bzw. [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid in Radioligandbindungsstudien vergleichend an der Chimäre I<sub>Y1205A</sub> analysiert. Diese Chimäre besitzt anders als die physiologisch vorkommenden Isoformen des SUR beide Bindungsstellen (für Sulfonylharnstoffe und Kalium-Kanal-Öffner) in hochaffiner Form (s.a. 4.1.2).

Ausgangspunkt für das Modellierung der Tertiärstrukturen der NBF1 und NBF2 des SUR war die hochauflösende Kristallstruktur einer humanen Nukleotid-bindenden Untereinheit (s.a. 4.1.3). Diese 3D-Strukturen bieten eine Grundlage zur Interpretation funktioneller Konsequenzen von Mutationen, die mit der Störung der Insulinsekretion (SUR1) einhergehen oder analog z.B. für kardiovaskuläre Erkrankungen (SUR2A und SUR2B) verantwortlich sein könnten.

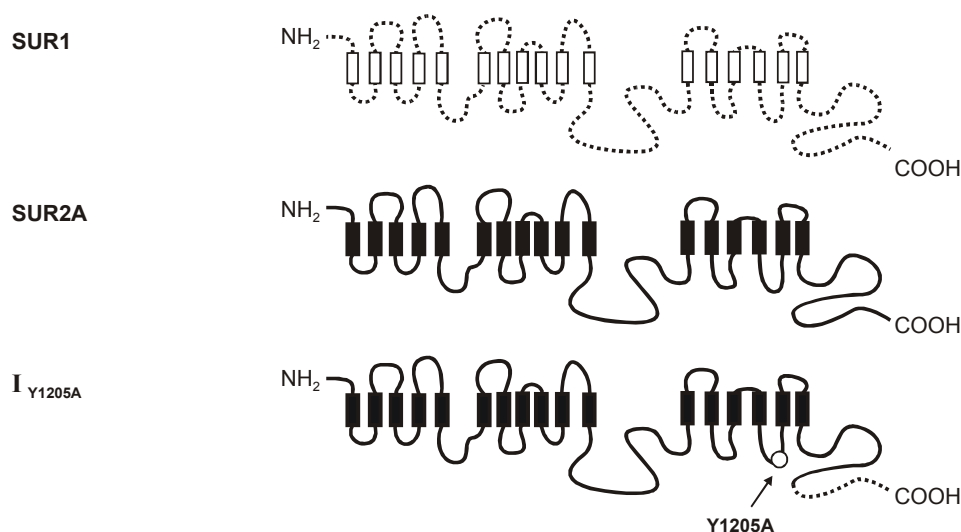
#### **4.1.2 Charakterisierung des Chimäre I<sub>Y1205A</sub>**

Während SUR1 eine hohe Affinität für die Bindung von SUs wie z.B. Glibenclamid aufweist, zeigen die SUR2-Isoformen eine deutlich niedrigere Affinität für die Bindung dieser Substanzen. Für die Bindung von KCOs wie z.B. P1075, Pinacidil oder Diazoxid hingegen verhalten sich die Affinitäten der Isoformen des Rezeptors umgekehrt. Eine kritische Rolle für die Bindung der KCOs spielen u.a. die NBFs des Rezeptors, wobei der Austausch der NBF1 und NBF2 des SUR2A gegen die korrespondierenden Bereiche des SUR1 keinen Einfluss auf die Affinitäten von P1075 und Pinacidil zeigte (SCHWANSTECHE et al., 1998; UHDE, 2001).

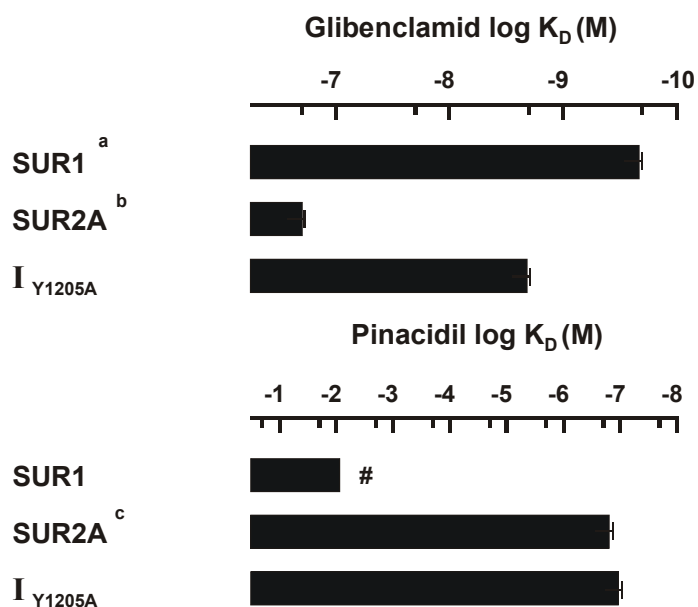
Um Mutationen in den NBFs des SURs detailliert zu analysieren, wurde eine Chimäre des Rezeptors konstruiert, die neben der für SUR2-Isoformen typischen hohen Affinität für KCOs, ebenfalls eine für die SUR1-Isoform charakteristische hohe Affinität für SUs besitzt (TOMAN, 2001). Die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> vereinigt die Eigenschaften beider Isoformen SUR1 und SUR2A (Abb. 12) und bildet damit eine Grundlage zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der Nukleotid-bindenden Untereinheiten des SUR.



**A**



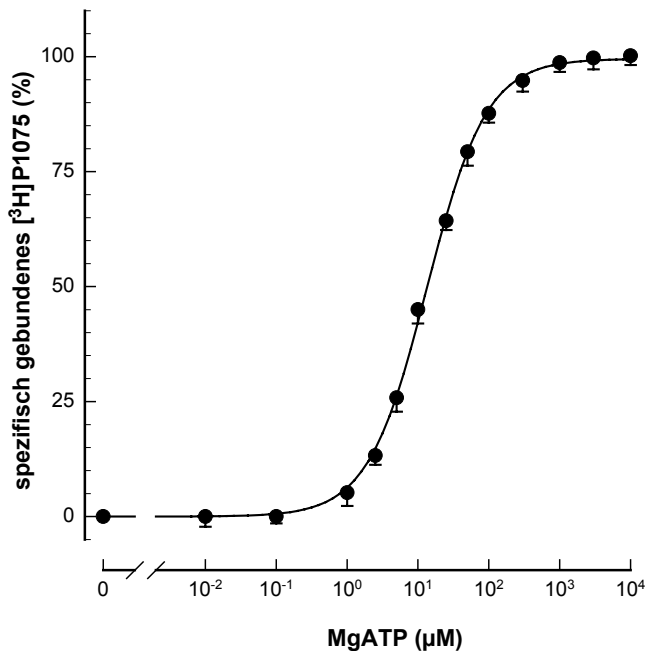
**B**



**Abb. 12** Charakterisierung der Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>*. Teil **A** der Abbildung zeigt eine schematische Übersicht des SUR1, SUR2A und der Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>* in der von TUSNADY et al., 1997 und CONTI et al., 2001 vorgeschlagenen Membrantopologie. Die Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>* besteht aus dem Rückgrat des rat SUR2A (Aminosäuresequenz: AS 1-1503), den 42 C-terminalen Aminosäuren des ham SUR1 (AS 1541-1582 in Position der AS 1504-1545 des rat SUR2A) und einer Substitution des Tyrosins in Pos. 1205 (○) in der Sulfonylharnstoff-bindenden Region (SUBR) gegen Alanin (UHDE et

al., 1999; TOMAN, 2001). In Teil **B** der Abbildung sind die Dissoziationskonstanten für Glibenclamid und Pinacidil für die Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>* im direkten Vergleich zu den Isoformen SUR1 und SUR2A angegeben (<sup>a</sup> SIEVERDING, 1998a; <sup>b</sup> DÖRSCHNER et al., 1999; <sup>c</sup> SCHWANSTECHEER et al., 1998). Aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelexperimenten ergaben sich folgende  $K_D$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) für Glibenclamid: SUR1  $0,44 \pm 0,11$  nM (-0,96), SUR2A  $0,29 \pm 0,04$   $\mu$ M (-1,01) und Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>*  $4,3 \pm 0,23$  nM (-0,99) bzw. für Pinacidil: SUR1  $>10$  mM (# der  $K_D$ -Wert für Pinacidil an SUR1 wurde aus dem  $K_D$  für P1075 an SUR1 (GROSS et al., 1999) unter der Annahme eines konstanten Faktors für die Verschiebung der Affinitäten für P1075 und Pinacidil errechnet), SUR2A  $0,40 \pm 0,02$   $\mu$ M (-0,98) und Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>*  $0,11 \pm 0,02$   $\mu$ M (-1,01). Für die Affinitäten von Chimäre *I<sub>Y1205A</sub>* s.a. TOMAN, 2001.

C



Teil **C** der Abbildung zeigt den Einfluss der Konzentration von MgATP auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 an Chimäre I<sub>Y1205A</sub>. Die Induktion der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem Mg<sup>2+</sup> wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> exprimierten. Die Inkubationen wurden in 500 µl Ansätzen durchgeführt, die 3 nM [<sup>3</sup>H]P1075, die angegebenen Konzentrationen eines Mg-Komplexes von ATP und 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> enthielten. Durch Zugabe von Membranen wurden die Inkubationen gestartet und nach 60 min durch Filtration

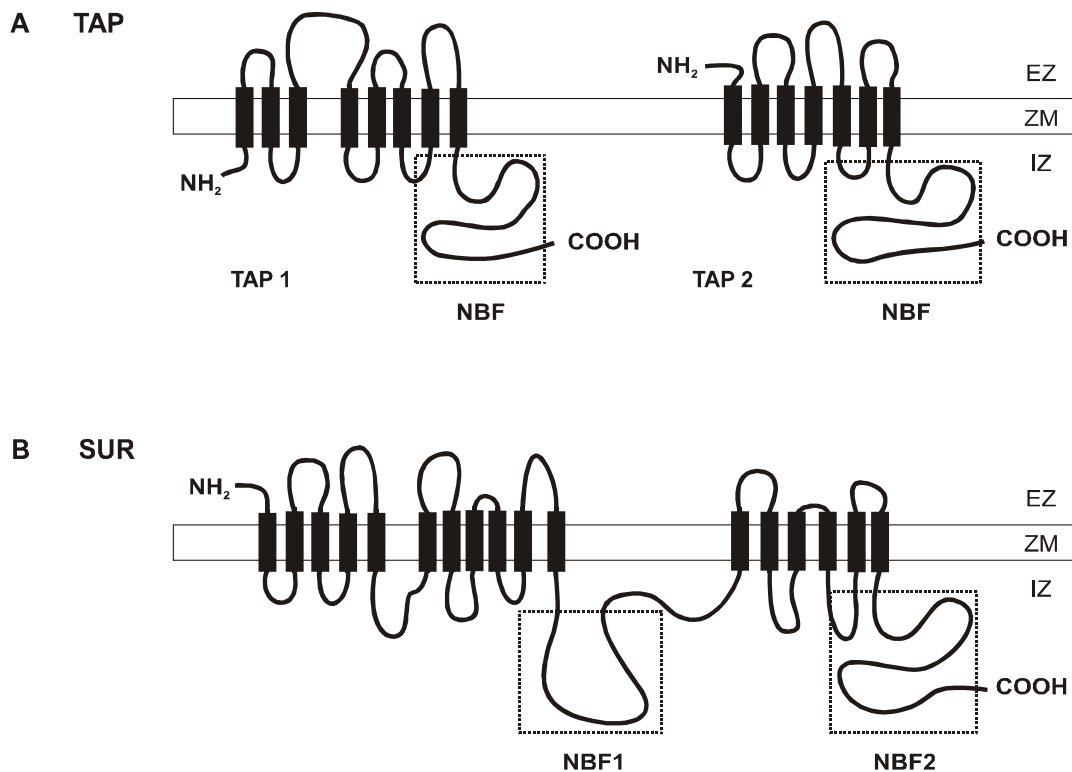
beendet (s.a. 3.8.5). Das Ergebnis ist in Prozent der spezifischen Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 in Gegenwart von 10 mM MgATP angegeben. Die unspezifische Bindung wurde in Reaktionsansätzen ermittelt, die zusätzlich 100 µM Pinacidil enthielten. Aus den Mittelwerten ± SEM und der resultierenden Bindungskurve ergab sich aus N = 7 unabhängigen Einzelexperimenten ein EC<sub>50</sub>-Wert und Hill-Koeffizient (in Klammern) von 14 ± 2 µM (1,01).

#### 4.1.3 3D-Modelling der NBFs von SUR2A

Zur Aufklärung der Funktion von Proteinen ist die Kenntnis der Raumstrukturen wesentlich. Diese können durch Röntgenstrukturanalysen an Proteinkristallen erhalten werden. Während für die Kristallbildung wasserlöslicher, kleiner Proteine Routineverfahren zur Verfügung stehen, ist die Kristallisierung lipophiler, großer Membranproteine äußerst schwierig und bislang für komplette ABC-Transporter (ABC = ATP binding cassette; ATP-bindende Kassettenproteine) nicht gelungen (SCHNEIDER, 2000). Im Jahre 1998 konnte durch Kristallisierung einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBF) der bakteriellen Histidinpermease (HisP) von *Salmonella typhimurium* (HUNG et al., 1998) erstmals die Tertiärstruktur eines Nukleotid-bindenden Proteins von ABC-Transportern aufgeklärt werden. Zwischenzeitlich ist die Struktur Nukleotid-bindender Untereinheiten zahlreicher ABC-Proteine bekannt (HUNG et al., 1998; DIEDERICHS et al., 2000; GAUDET und WILEY, 2001; KARPOWICH et al., 2001; LAMERS et al., 2000; YUAN et al., 2001). Auf Basis von Röntgenstrukturanalysen verwandter ABC-Proteine und Sequenzvergleichen ließen sich die 3D-Strukturen der NBFs des SUR als

Homologie-Modelle ableiten. Berechnungsgrundlage dazu war eine Untereinheit des humanen Antigen Peptid Transporters, des sog. TAP1, die eine sehr große Sequenzhomologie zu den NBFs des Sulfonylharnstoffrezeptors zeigte (Abb. 13 und 14).

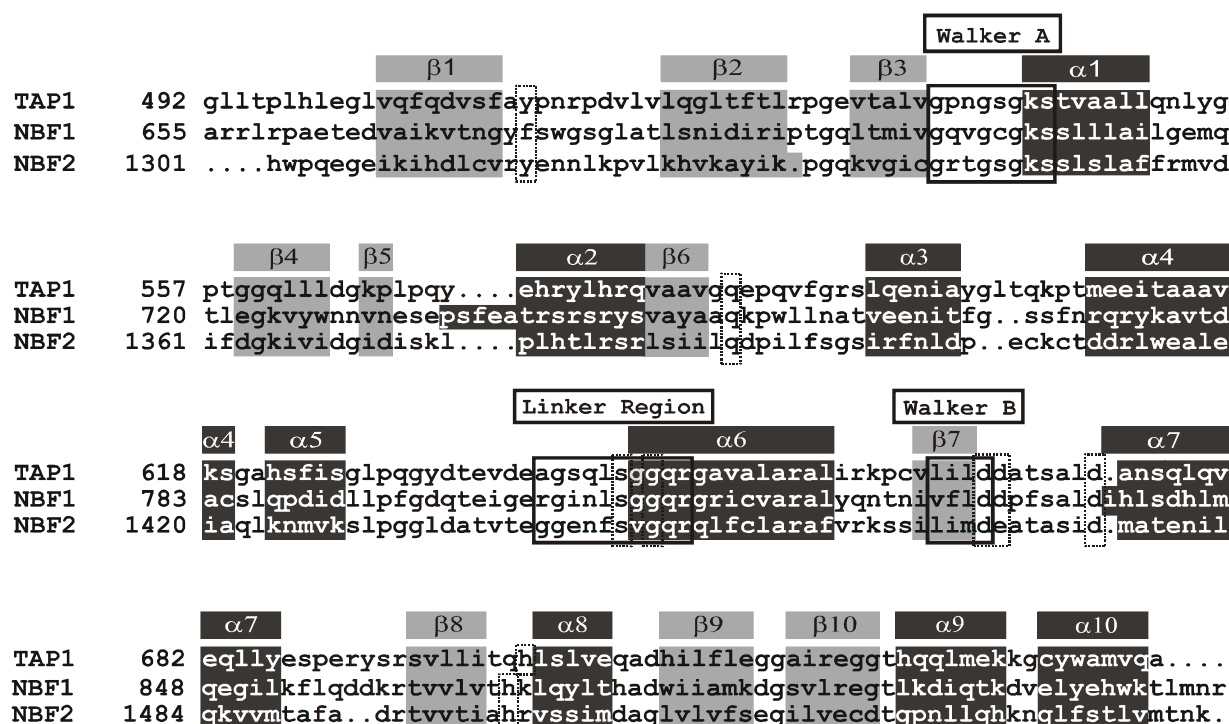
Der humane Antigen Peptid Transporter (TAP), der als Bestandteil der Immunabwehr an der Translokation von in Proteasomen verdauten cytosolischen Peptiden zum endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist, besteht als heterodimerer Komplex aus zwei strukturell sehr ähnlichen Untereinheiten: TAP1 und TAP2 (KELLY et al., 1992). Diese Untereinheiten gliedern sich jeweils in eine N-terminale transmembranäre Domäne mit acht (für TAP1) bzw. sieben (für TAP2) membranspannenden Regionen und eine intrazellulär lokalisierte C-terminale ATPase Einheit: der Nukleotid-bindenden Domäne - der NBF (VOS et al., 1999).



**Abb. 13** Vergleich der Membrantopologie des humanen Antigen Peptid Transporters (TAP) und des Sulfonylharnstoffrezeptors (SUR). Teil **A** der Abbildung zeigt die transmembranäre Topologie des humanen Antigen Peptid Transporters mit den Untereinheiten TAP1 und TAP2 (KELLY et al., 1992; VOS et al., 1999). In Teil **B** der Abbildung ist die Topologie des SUR dargestellt (TUSNADY et al., 1997; CONTI et al., 2001). Die NBFs sowohl des TAP als auch des SUR sind intrazellulär (IZ) lokalisiert (EZ = extrazellulär, ZM = Zellmembran; s.a. 1.8.2).

#### 4.1.3.1 Sequenzvergleich der NBF des TAP1 und der NBFs des SUR2A

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zeigte einen hohen Grad an Konservierung zwischen der NBF des TAP1 einerseits und der NBF1 und NBF2 des SUR2A andererseits, wobei die Übereinstimmungen in den für ABC-Proteine charakteristischen Motiven wie Walker A Motiv, Walker B Motiv und der sog. Linker Region natürlich besonders stark ausgeprägt waren. Insbesondere die identische Abfolge von  $\beta$ -Faltblatt- und  $\alpha$ -Helix-Strukturen in den drei Proteinen jedoch war Hinweis auf eine sehr ähnliche Tertiärstruktur und Symmetrie zwischen NBF1 und NBF2 des SUR (Abb. 14).



**Abb. 14** *Sequenzvergleich der NBFs des humanen TAP1 und rat SUR2A.* Die jeweils erste Zeile der Reihen zeigt einen Sequenzausschnitt der NBF des humanen Antigen Peptid Transporters TAP1, die zweite und dritte Zeile die Aminosäureabfolgen der NBF1 und NBF2 des rat SUR2A. Die Positionierung dieser Aminosäuren im Gesamtprotein ist am linken Rand der Zeilen angegeben. Die Sekundärstrukturen mit  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 1$  bis  $\alpha 10$ ) und  $\beta$ -Faltblatt-Elementen ( $\beta 1$  bis  $\beta 10$ ) sind über den Reihen bzw. durch schwarze und graue Unterlegungen der Aminosäuresequenzen dargestellt. Die charakteristischen Motive eines ABC-Proteins: Walker A, Walker B und die sog. Linker Region, als auch hochkonservierte Aminosäuren (s.a. 4.2) sind durch durchgezogene bzw. gepunktete Umrahmungen hervorgehoben. Das Multiple Alignment der Sequenzen wurde nach der Cluster-Methode mit Hilfe des ClustalX durchgeführt (s.a. 3.9).

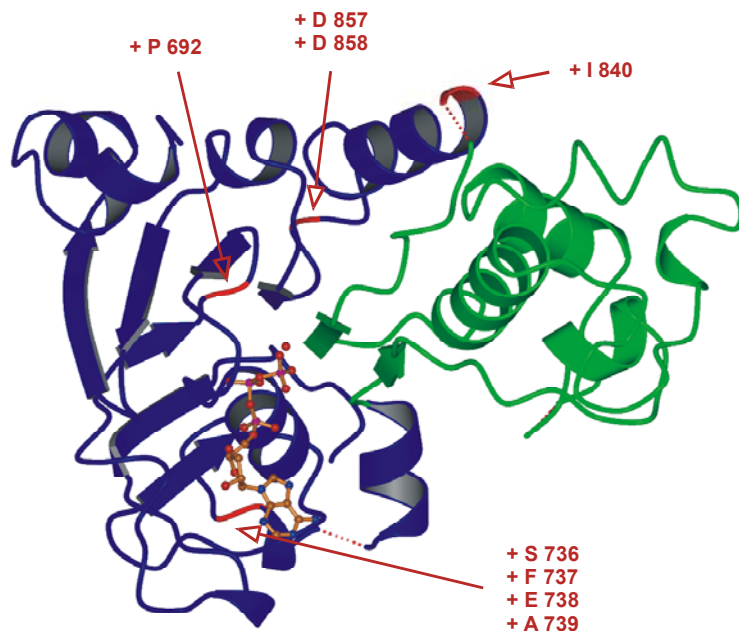


**Abb. 15** *Analogmodell für die Tertiärstrukturen der NBFs in SURs.* Diese Abbildung zeigt ein Modell der NBF1 bzw. NBF2 des SUR2A basierend auf den Koordinaten der hochauflösenden Kristallstruktur der C-terminalen ATPase Domäne des humanen Antigen Peptid Transporters TAP1 (PDB identifier: 1JJ7; GAUDET und WILEY, 2001). Farblich hervorgehoben sind die für die Familie der ABC-Transporter charakteristischen Motive: Walker A Motiv (rot), Walker B Motiv (grün) und die sog. Linker Region (blau). Die Organisation der Sekundärstrukturen mit  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Elementen ist mit  $\alpha 1$  bis  $\alpha 10$  bzw.  $\beta 1$  bis  $\beta 10$  angegeben. Für den Sequenzvergleich wurde das Programm BRAGI (SCHOMBURG und REICHEL, 1988) und zur Berechnung der Analogmodelle das „program O“ (JONES, 1985) verwendet. Zur Bildgebung der Strukturen kam die Anwendung MolScript (KRAULIS, 1991) zum Einsatz. Das Analogmodell wurde schließlich mit gl\_render (ESSER L., unveröffentlicht) und POV-Ray<sup>TM</sup> dargestellt (s.a. 3.9 und 3.10).

#### 4.1.3.3 Strukturelle Symmetrie der NBF1 und NBF2 des SUR2A

Zur Analyse der strukturellen Ähnlichkeiten bzw. Abweichungen der NBF1 von NBF2 wurden die Analogmodelle der beiden NBFs überlagert. Trotz diskreter Unterschiede der Tertiärstrukturen von NBF1 und NBF2 durch Insertionen in NBF1 im Vergleich zu NBF2 in den Positionen P692 und I840, einem Cluster von vier Aminosäuren in den Positionen S736 bis A739 und zweier Aspartate in den Positionen D857 und D858, zeigte sich eine weitgehende strukturelle Symmetrie der Modelle für die NBF1 und NBF2 des SUR2A (Abb. 16).

**Abb. 16** *Überlagerung der Modelle für NBF1 und NBF2 des SUR2A.* Diese Abbildung zeigt zum einen die strukturelle Organisation einer NBF in die beiden in grün und blau farblich abgegrenzten Hauptdomänen, zum anderen ist durch Überlagerung der Modelle für NBF1 und NBF2 neben diskreten Unterschieden der NBFs eine weitgehende strukturelle Symmetrie zu erkennen. Abweichungen in den Tertiärstrukturen durch Insertionen von Aminosäuren in NBF1 im Vergleich zu NBF2 in den Positionen P692, S736 bis A739, I840, D857 und D858 sind rot hervorgehoben. (weitere Details: siehe Abb. 15)



## **4.2 Charakterisierung hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs des SUR2A**

### **4.2.1 Einführung**

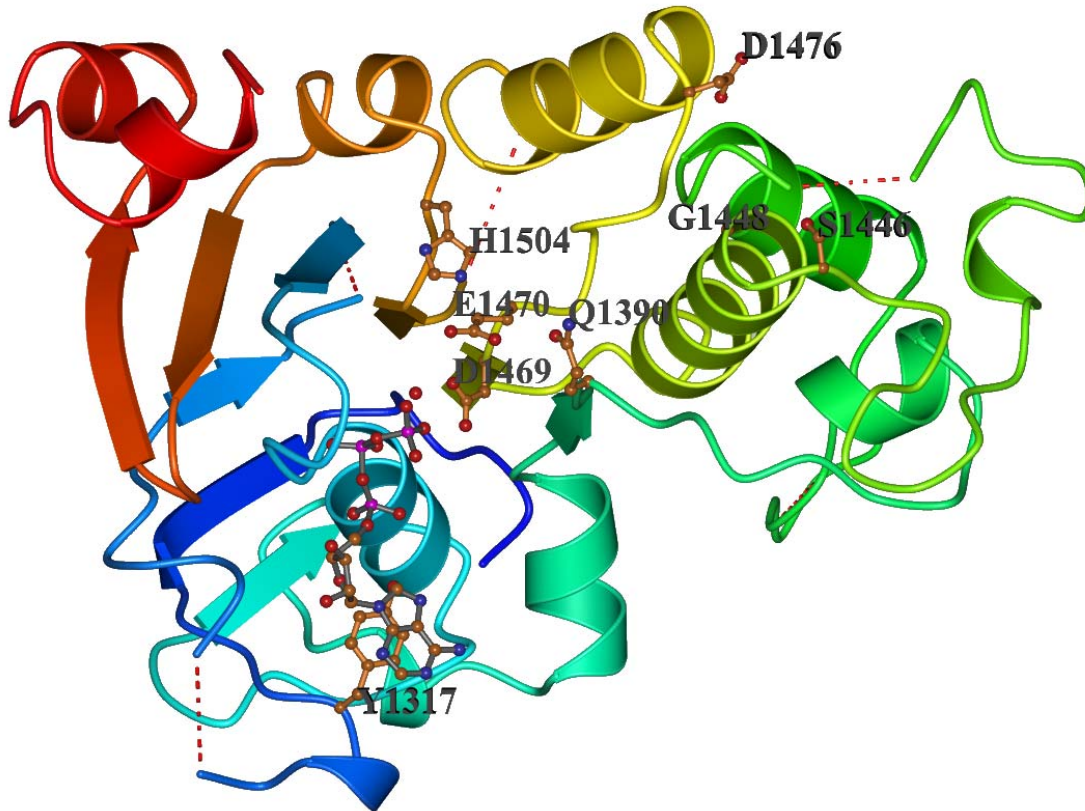
Aus röntgenkristallographischen Untersuchungen Nukleotid-bindender Untereinheiten diverser ABC-Transporter wie z.B. HisP (HUNG et al., 1998), TAP1 (GAUDET und WILEY, 2001), MutS (LAMERS et al., 2000), MalK (DIEDERICHs et al., 2000) etc. und Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Relevanz bestimmter Regionen einer NBF sind Aminosäurereste bekannt, die kritisch sind für die Bindung des ATP bzw. für eine Konformationsänderung des Proteins nach erfolgter ATP-Hydrolyse (CROOP, 1998; HUNG et al., 1998; BERGER und WELSH, 2000; DIEDERICHs et al., 2000; LAMERS et al., 2000; GAUDET und WILEY, 2001; SAVEANU et al., 2001).

### **4.2.2 Bedeutung hochkonservierter Aminosäuren in der NBF2 des SUR2A**

Abb. 17 zeigt hochkonservierte Aminosäuren (s.a. 4.1.3.1, Abb. 14) im Modell der Tertiärstruktur der NBF2 des SUR2A, für die sich auf Basis der Daten verwandter Protein-Untereinheiten Schlüsselfunktionen ableiten lassen (s.a. TAWAKKOL, 2001).

Tyrosin in Pos. 1317 stabilisiert entsprechend diesem Modell die Orientierung des ATP über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Aromaten der Aminosäure und der Adeninbase des Nukleotids. Der Histidin-Rest in Pos. 1504 unterstützt über Wasserstoffbrücken-Bindungen die Ausrichtung des  $\gamma$ -Phosphates des ATP. Das Glutamin in Pos. 1390 ist ebenso wie das in Pos. 1470 lokalisierte Glutamat an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen zu dem Wassermolekül beteiligt, das mit dem  $\gamma$ -Phosphat des Nukleotids interagiert und vermutlich für die Hydrolyse von zentraler Bedeutung ist. Eine vor allem strukturelle Funktion trägt vermutlich das Aspartat in Pos. 1476 durch die besonders exponierte Position am Anfang der sehr langen siebten  $\alpha$ -Helix-Struktur. Die Aminosäuren Glycin in Pos. 1448 und Serin in Pos. 1446 sind als Bestandteil der Linker Region nach erfolgter ATP-Bindung und -Hydrolyse essentiell für die Übertragung der Konformationsänderung der ATP-bindenden Domäne auf das Gesamtprotein. Besonders wichtig ist auch der Aspartat-Rest in Pos. 1469 am Ende des Walker B Motivs, der vermutlich das Magnesium-Ion während der hydrolytischen Zyklen stabilisiert.



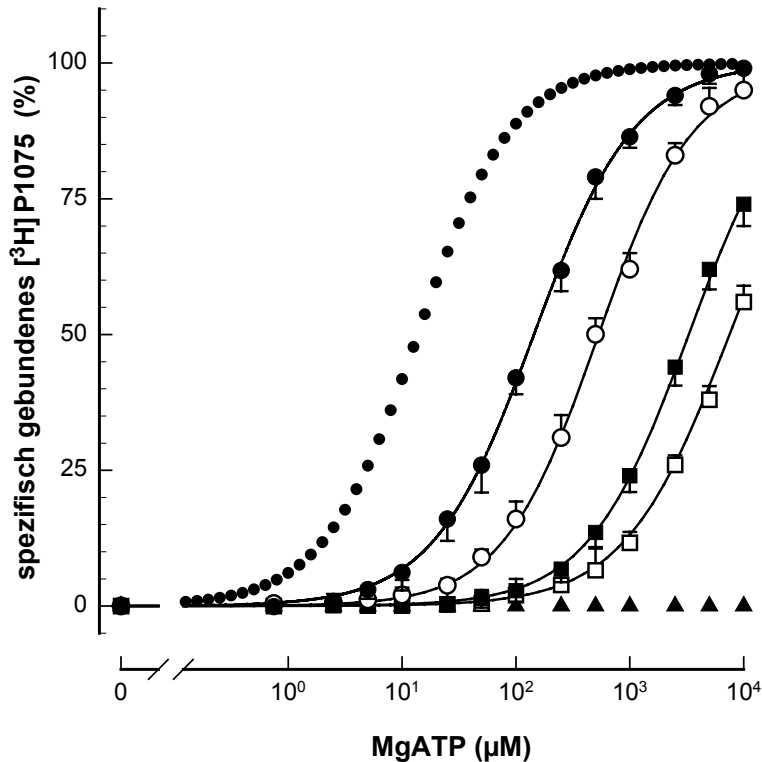


**Abb. 17** Hochkonservierte Aminosäuren in NBF2 des SUR2A. Diese Abbildung zeigt in ABC-Transportern hochkonservierte Aminosäuren in NBF2 des SUR2A, für die sich aus dem Modell jeweils eine Schlüsselfunktion für die Bindung von ATP bzw. für eine Konformationsänderung nach erfolgter ATP-Hydrolyse ableiten lässt. Diese Reste sind entweder speziell exponiert (D1476) bzw. im Bereich der sog. Linker Region (S1446, G1448) lokalisiert oder sie stabilisieren das Adenin und  $\gamma$ -Phosphat des ATP (Y1317, Q1390, D1470, H1504) bzw. das  $Mg^{2+}$ -Ion während der hydrolytischen Zyklen (D1469). Weitere Details: siehe Abb. 15.

#### 4.2.3 Substitution hochkonservierter Aminosäuren in der NBF2 des SUR2A

Die funktionelle Relevanz dieser hochkonservierten Aminosäuren wurde in Radioligandenbindungsstudien durch den Einfluss von Substitutionen auf die hochaffine Bindung von [ $^3H$ ]-markierten P1075 analysiert (Abb. 18). In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ATPase-Aktivität in beiden NBFs des SUR vorhanden ist (UEDA et al., 1999; Bienen-graeber et al., 2000) und die Bindung von [ $^3H$ ]P1075 vermutlich ATP-Bindung und -Hydrolyse in den NBFs erfordert (SCHWANSTECHEr et al., 1998). Nicht hydrolysierbare Nukleotidanaloga wie AMP-PNP und AMP-PCP führten zu einem kompletten Verlust der Bindung, während sich Substitutionen in funktionell wichtigen Positionen in den NBFs in einer partiellen bzw.





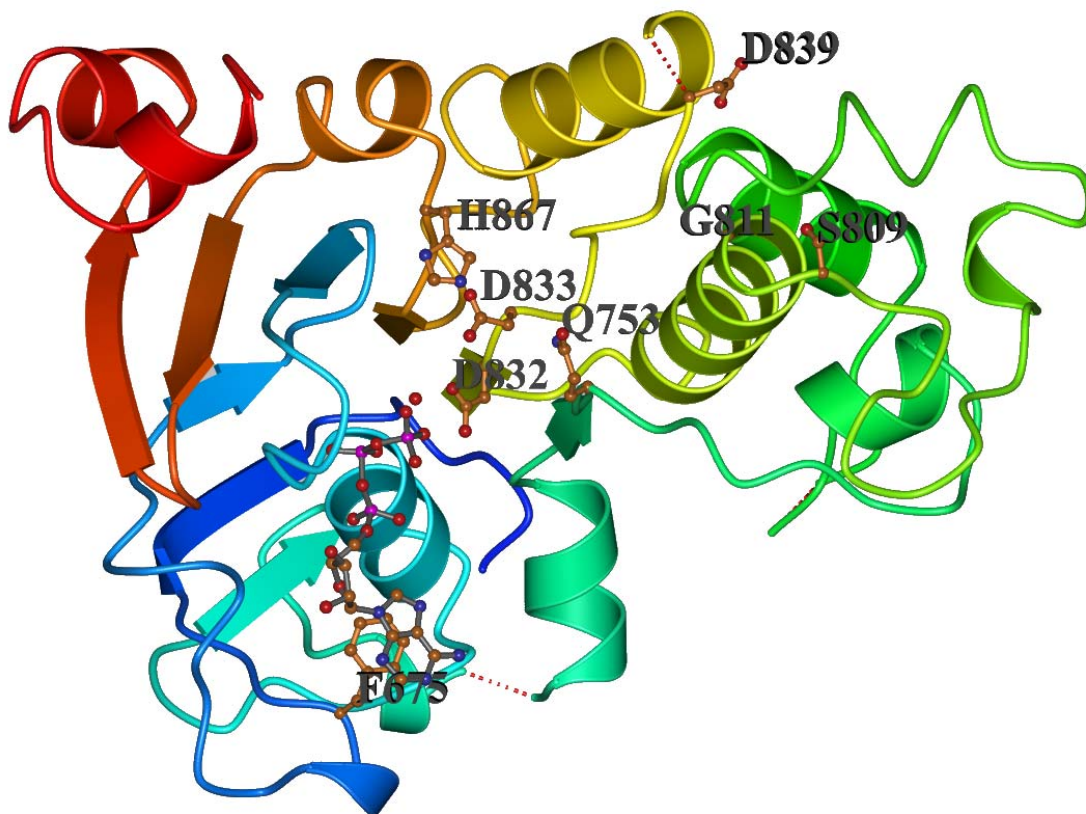
**Abb. 18** Einfluss der Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in NBF2 auf die MgATP-induzierte Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075. Die Induktion der Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $\text{Mg}^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> mit den angegebenen Punktmutationen exprimierten. Die Inkubationen wurden in 500 µl Ansätzen durchgeführt, die 3 nM  $[^3\text{H}]$ P1075, die angegebenen Kon-

zentrationen des Mg-Komplexes von ATP und 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  enthielten. Durch Zugabe von Membranen wurden die Inkubationen gestartet und nach 60 min durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Die Ergebnisse sind angegeben in Prozent der spezifischen Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075 in Gegenwart von 10 mM MgATP bzw. der theoretisch zu erwartenden Maximalbindung, die durch parallele Analyse der Bindung von  $[^3\text{H}]$ Glibenclamid errechnet wurde. Die unspezifische Bindung wurde in Reaktionsansätzen ermittelt, die zusätzlich 100 µM Pinacidil enthielten. Aus den Mittelwerten  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) und den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $\text{EC}_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelerperimenten: (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $14 \pm 2$  µM (1,01), (●) Q1390E in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,14 \pm 0,02$  mM (1,02), (○) Y1317S in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,52 \pm 0,04$  mM (1,02), (■) E1470K in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $4,6 \pm 0,3$  mM (1,04) und (□) H1504E in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $7,5 \pm 0,4$  mM (0,96). (▲) Die Mutationen S1446F, G1448I, D1469E und D1476R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> zeigten im Konzentrationsbereich bis zu 10 mM MgATP einen kompletten Verlust der Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075.

kompletten Aufhebung der Bindung äußerten (SCHWANSTECHE et al., 1998). Damit übereinstimmend zeigte sich, dass die Substitutionen im Bereich der Linker Region mit Serin in Pos. 1446 gegen Phenylalanin und Glycin in Pos. 1448 gegen Isoleucin, das für die siebte  $\alpha$ -Helix strukturell wichtige Aspartat in Pos. 1476 gegen Arginin und der Austausch des  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion stabilisierenden Aspartats gegen Glutamat zu einer vollständigen Aufhebung der ATP-induzierten Bindung von  $[^3\text{H}]$ P1075 führten. Bei Substitutionen der Aminosäuren, die an der Koordination des  $\gamma$ -Phosphats des ATP beteiligt sind: Glutamin in Pos. 1390 gegen Glutamat, Glutamat in Pos. 1470 gegen Lysin und Histidin in Pos. 1504 gegen Glutamat zeigte

sich ebenso wie auch bei der Substitution des für die Stabilisierung des Adenins essentiellen Tyrosins in Pos. 1317 gegen Serin jeweils eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch MgATP. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Ergebnissen für andere ABC-Transporter überein (HUNG et al., 1998; DIEDERICHS et al., 2000; LAMERS et al., 2000; GAUDET und WILEY, 2001; KARPOWICH et al., 2001; YUAN et al., 2001) und entsprechen damit dem Ausgangsmodell des TAP1 (PDB identifier: 1JJ7; s.a. 4.1.3).

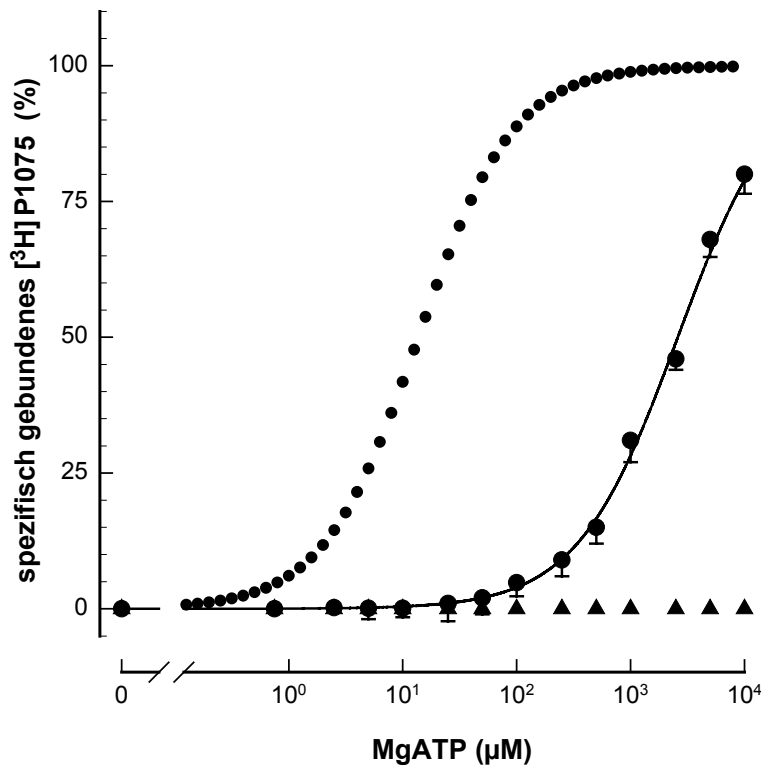
#### 4.2.4 Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren in NBF1 des SUR2A



**Abb. 19** Hochkonservierte Aminosäuren in NBF1 des SUR2A. Diese Abbildung zeigt die den hochkonservierten Aminosäuren in NBF2 (Abb. 17) entsprechenden Aminosäuren in NBF1 des SUR2A (Weitere Details: siehe Abb. 15).

Die Untersuchung analoger Punktmutationen in NBF1 (Abb. 19) ergab ein ganz ähnliches Bild für die funktionellen Konsequenzen, wobei die Effekte in NBF1 jeweils deutlich stärker

ausgeprägt waren, als in NBF2 (Abb. 20). So führte die Substitution des Glutamin-Restes in Pos. 753 gegen Glutamat zu einer deutlich stärkeren Rechtsverschiebung als die entsprechende Substitution Q1390E in NBF2. Neben den Austauschen des Serins in Pos. 809 gegen Phenylalanin, Glycins in Pos. 811 gegen Isoleucin, Aspartats in Pos. 832 gegen Glutamat und des Aspartats in Pos. 839 gegen Arginin, die auch in analogen Positionen in NBF2 keine Bindung zeigten, wurde auch für die Substitution des Aspartats in Pos. 833 gegen Lysin und Histidins in Pos. 876 gegen Glutamat eine komplette Aufhebung der Bindung beobachtet. Die entsprechenden Substitutionen in NBF2 führten zwar zu einer Rechtsverschiebung der Induktion der Bindung durch MgATP, nicht aber zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075.



**Abb. 20** Einfluss der Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in NBF1 auf die MgATP-induzierte Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075. Die Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $\text{Mg}^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> mit den angegebenen Punktmutationen exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter ent-

sprechen den Angaben der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $\text{EC}_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelexperimenten: (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $14 \pm 2 \mu\text{M}$  (1,01) und (●) Q753E in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $2,6 \pm 0,3 \text{ mM}$  (0,97). (▲) Alle weiteren zur NBF2 analogen Mutationen F675S, S809F, G811I, D832E, D833K, D839R und H867E in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> führten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075.

Diese Befunde sind ein Indiz dafür, dass sich eine Reduktion der Affinität für ATP in NBF1 stärker auf die Funktion des Sulfonylharnstoffrezeptors auswirkt, als eine Reduktion der Affinität in NBF2.

#### 4.2.5 Stabilisierung des Nukleotid-Adeninrings

Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurde eine Serie von Substitutionen eines Restes durchgeführt, der eine kritische Bedeutung für die Stabilisierung des ATP-Moleküls und somit für die für eine KCO-Bindung erforderliche Konformationsänderung besitzt (vgl. auch Abb. 17 und 19). Dieser Rest - eine aromatische Aminosäure - liegt ca. 25 Positionen vor dem Walker A Motiv und ist in der Gruppe der ABC-Transporter hochgradig konserviert (Abb. 21).

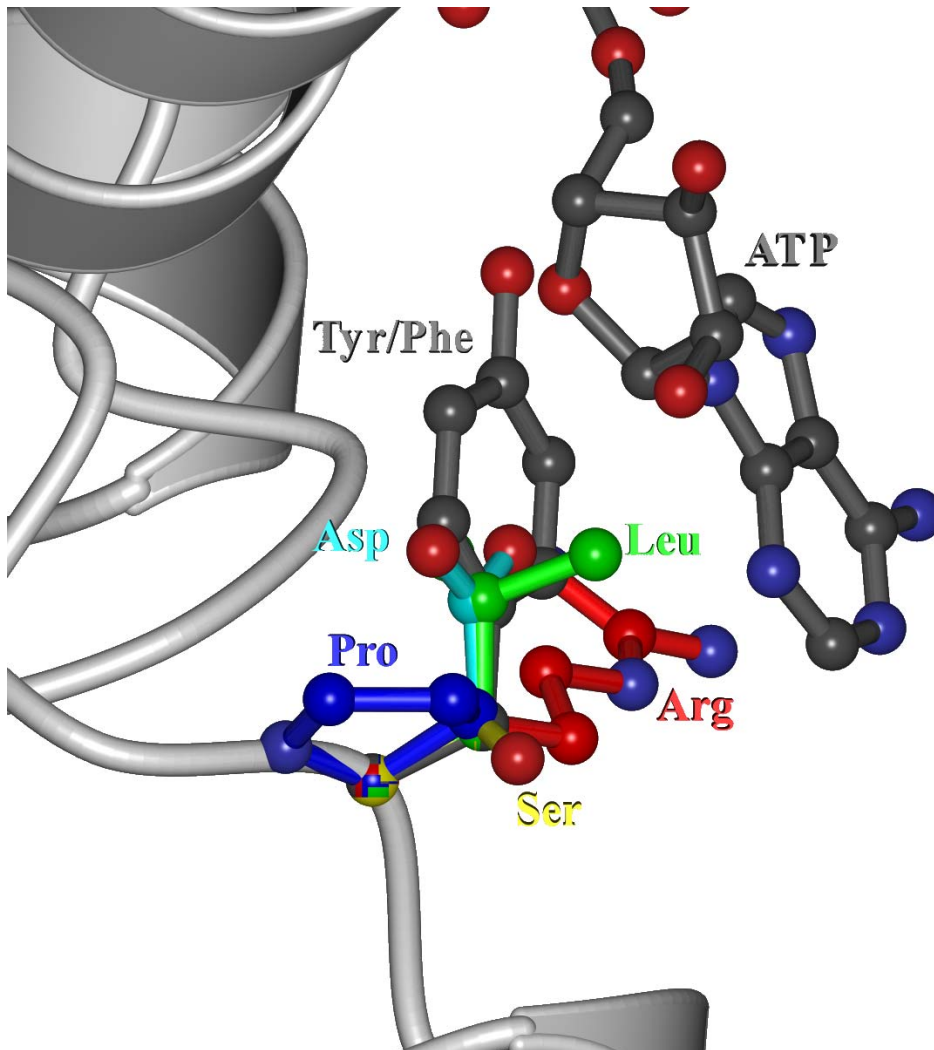
			β1		β2		β3		α1
NBF1	SUR1	(F685)	ADNFCVQIIGGFF	TTWTPDGIPT	LSNITIRIPRG	QLTMI	VGQVCGCKSS	LLLLATLGEM	
NBF2	SUR1	(Y1354)	QGKIQIQNLSVRY	DSS..	LKPVLKHVNTLIS	PGQKIGIG	GRTGSGCKSS	FSLAFFRMV	
NBF1	SUR2	(F675)	TEDVAIKVTNGYF	SWG..	SGLATLSNIDIRI	PTGQLTMI	VGQVCGCKSS	LLLLAILGEM	
NBF2	SUR2	(Y1317)	EGEIKIHDLCVRY	ENN..	LKPVLKHKVAYIK	PGQKVGIG	GRTGSGCKSS	LSLAFRMV	
NBF1	CFTR	(F433)	TSNGDDSLFFSN	FSL...	LGTPVLKDINFKI	ERGLLAVAG	STGAGKTS	LLMMIMGEL	
NBF2	CFTR	(Y1219)	GGQMTVKDLTAK	YTEG..	GNAILENISFSIS	PGQRVGLL	GRTGSGCKST	LLSAFLRLL	
NBF1	MDR1	(Y401)	KGNLEFRNVHFS	YPSRK..	EVKILKGLNLKV	QSGQTVALV	GNSGCGKST	TVQLMQRLY	
NBF2	MDR1	(Y1044)	EGNVTFGEVVF	NYPTRP..	DIPVLQGLSLEV	KKGQTLALV	GSSGCGKST	VVQLLERFY	
NBF	TAP1	(Y512)	EGLVQFQDVSF	AYPNRP..	DVLVLQGLTFT	LRPGVTALV	GPNGSGKST	VALLQONLY	
HisP		(Y16)	ENKLHVIDLHK	FYGG...	HEVLKGVSLQAR	AGDVISIIG	SSSGSGKST	FLRCINFLE	
MalK		(F13)	MAGVRLVDVWK	VFGE...	VTAVREMSLEV	KDGEFMILL	GPSGCGKST	TTLRMIAGLE	



Walker A

**Abb. 21** F675 in NBF1 von SUR2A ist hochkonserviert. Diese Abbildung zeigt Teilsequenzen diverser ABC-Proteine mit Angabe der  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Sekundärstrukturen (schwarz bzw. grau unterlegt) in einem Multiple Alignment (3.9). Zeile 1 und 2: NBF1 und NBF2 des SUR1 des Hamsters (ham SUR1, Kenn-Nr.: L40623), Zeile 3 und 4: NBF1 und NBF2 des SUR2A der Ratte (rat SUR2A, Kenn-Nr.: NM\_013040), Zeile 5 und 6: NBF1 und NBF2 des humanen CFTR Chlorid-Ionenkanals (hum CFTR, Kenn-Nr.: P13569), Zeile 7 und 8: NBF1 und NBF2 des humanen Multidrug Resistance Proteins 1 (hum MDR1, Kenn-Nr.: P08183), Zeile 9: NBF des humanen Antigen Peptid Transporters 1 (hum TAP1, Kenn-Nr.: AAC12906), Zeile 10: ATP-bindende Untereinheit A der Histidinpermease von Salmonella typhimurium (HisP, Kenn-Nr.: 1BOU-A) und Zeile 11: ATPase-Untereinheit des Maltose-Transportsystems von Thermococcus litoralis (MalK, Kenn-Nr.: 1G291). Eine aromatische Aminosäure, Tyrosin bzw. Phenylalanin, ca. 25 Reste vor dem Walker A Motiv ist in der Familie der ABC-Proteine hochgradig konserviert. Die Positionierung dieser Aminosäure im jeweiligen Gesamtprotein ist in Klammern angegeben und in den Teilsequenzen hervorgehoben.

Abb. 22 zeigt die Lokalisierung dieser Aminosäuren, Tyrosin in NBF2 bzw. Phenylalanin in NBF1, in der Bindungstasche für ATP am jeweiligen Ende des cytosolisch ausgerichteten Arms der Nukleotid-bindenden Domäne. Entsprechend der Modellvorstellung stabilisiert die aromatische Aminosäure Tyrosin bzw. Phenylalanin die Ausrichtung des ATP über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Ringsystem des Aromaten und der Adeninbase des Nukleotids (CROOP, 1998; HUNG et al., 1998; BERGER und WELSH, 2000).

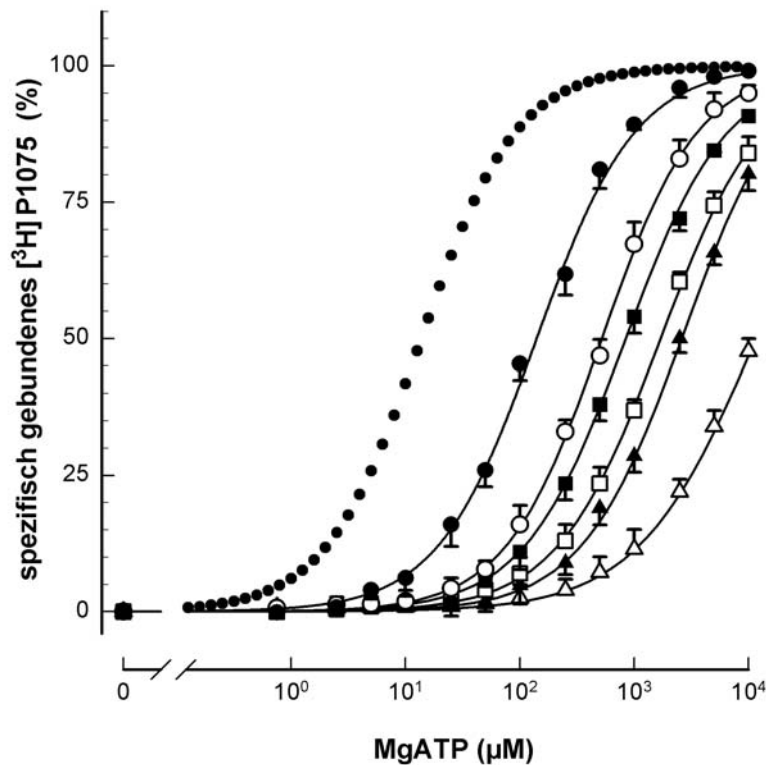


**Abb. 22** Stabilisierung des Adeninrings von ATP. Diese Abbildung zeigt eine Ausschnittvergrößerung der ATP-bindenden Domäne der NBF1 bzw. NBF2 des SUR und die Stabilisierung des ATP über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Ringsystem des Aromaten der hochkonservierten Aminosäuren Phenylalanin (F675 in NBF1) bzw. Tyrosin (Y1317 in NBF2) und der Adeninbase des Nukleotids. Durch Mutagenese eingeführte Substituenten in dieser Position sind überlagernd ergänzt und farblich abgegrenzt: Arginin (rot), Serin (gelb), Leucin (grün), Aspartat (cyan) und Prolin (blau). Weitere Details: siehe Abb. 15.

#### 4.2.6 Substitution von Y1317 in NBF2

Die Substitution des Tyrosins in Pos. 1317 gegen Arginin führte zu einer Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP zur Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$  um den Faktor 10 von 14  $\mu M$  auf 0,14 mM, die Mutation zu Serin zu einer weiteren Verschiebung um etwa den Faktor 4 auf 0,52 mM. Austausche gegen Leucin, Aspartat und Prolin induzierten weitere Änderungen auf 0,83 mM, 1,7 mM bzw. 2,7 mM. Bei Deletion des Tyrosin-Restes wurde schließlich ein  $EC_{50}$  von 12 mM MgATP beobachtet (Abb. 23).

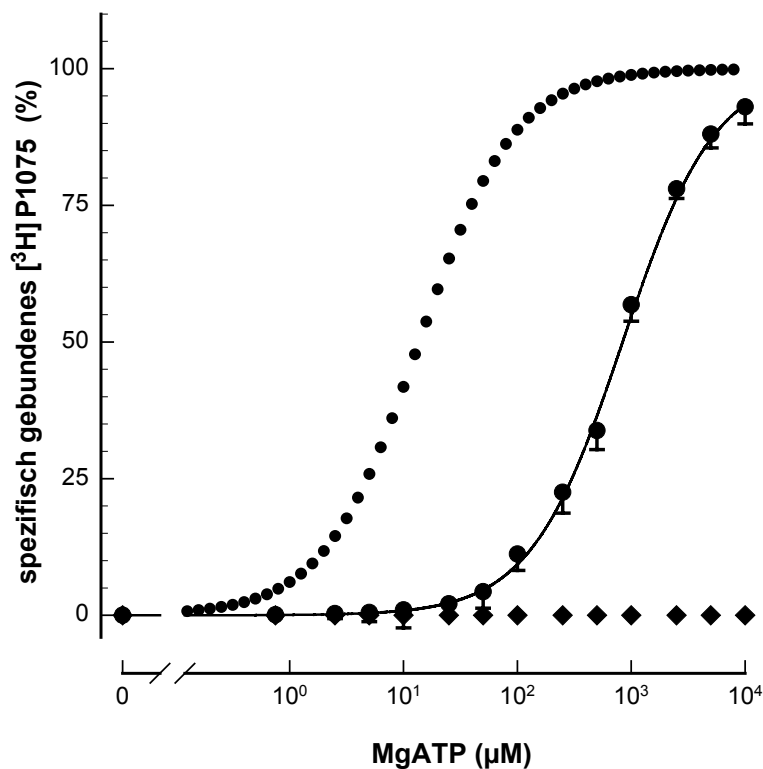
**Abb. 23** Einfluss der Substitution von Y1317 auf die MgATP-induzierte Bindung von  $[^3H]P1075$ . Die Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$  durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $Mg^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre  $I_{Y1205A}$  bzw. eine Serie von Punktmutationen dieses Restes exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter entsprechen den Angaben der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelerperimenten: (●●●) Chimäre  $I_{Y1205A}$   $14 \pm 2 \mu M$  (1,01), (●) Y1317R in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $0,14 \pm 0,03 mM$  (1,02), (○) Y1317S in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $0,52 \pm 0,04 mM$  (1,02), (■) Y1317L in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $0,83 \pm 0,07 mM$  (0,98), (□) Y1317D in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $1,7 \pm 0,1 mM$  (0,96), (▲) Y1317P in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $2,7 \pm 0,3 mM$  (0,96) und Deletion des Tyrosin-Restes (△) Y1317- in Chimäre  $I_{Y1205A}$   $12 \pm 1 mM$  (0,86).



#### 4.2.7 Substitution von F675 in NBF1

Die Analyse der analogen Substitutionen in NBF1 ergab qualitativ ein identisches Bild. Jede der Mutationen, die in NBF2 zu einer Rechtsverschiebung geführt hatte, induzierte auch in NBF1 eine Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP. Wie erwartet waren die Effekte in NBF1 wiederum deutlich stärker ausgeprägt als in NBF2. Die Substitution gegen Arginin führte in NBF2 zu einer Rechtsverschiebung um den Faktor 10, während in NBF1 eine Änderung um den Faktor 60 auf 0,84 mM MgATP beobachtet wurde. Alle weiteren analogen Substitutionen und die Deletion des Phenylalanins führten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3$ H]P1075 (Abb. 24).

**Abb. 24** Einfluss der Substitution von F675 auf die MgATP-induzierte Bindung von [ $^3$ H]P1075. Die Induktion der Bindung von [ $^3$ H]P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $Mg^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> bzw. eine Serie von Punktmutationen dieses Restes exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter entsprechen den Angaben



der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelexperimenten: (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $14 \pm 2 \mu M$  (1,01) und (●) F675R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,84 \pm 0,02 \text{ mM}$  (1,02). (◆) Alle weiteren zur NBF2 analogen Mutationen F675S, F675L, F675D, F675P und die Deletion des Phenylalanin-Restes F675- in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> führten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3$ H]P1075.

Zur Diskussion der molekularen Ursachen für einen partiellen oder kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Substitutionen und Deletionen der hochkonservierten aromatischen Aminosäuren Tyrosin in NBF2 bzw. Phenylalanin in NBF1 siehe: 5.4.1 und 5.4.2.

#### **4.2.8 Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs des SUR führen nicht zu Änderungen der Affinitäten für SUs und KCOs**

Zahlreiche Substitutionen und Deletionen hochkonservierter Aminosäuren führten zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075. Um eine mangelhafte Expressionsdichte, fehlerhafte Transportmechanismen und inkorrekte Faltung des Membranproteins etc. als Ursache für den Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 ausschließen zu können, wurden Kontrollexperimente zur Bindung von SUs durchgeführt. Trotz komplettem Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075, konnte bei allen Mutationen Bindung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid detektiert werden. Dies belegt Membranständigkeit und korrekte Faltung der Mutanten. Darüber hinaus zeigte keine der Mutationen im Verdrängungsassay von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid einen im Vergleich zur Chimäre I<sub>Y1205A</sub> signifikanten Unterschied im IC<sub>50</sub>-Wert und Hill-Koeffizient (Tab. 1 und Abb. 25).

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass Mutationen in den NBFs zu einer Rechtsverschiebung des EC<sub>50</sub> für MgATP zur Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 führen können (TAWAKKOL, 2001). Um den Einfluss der hier untersuchten Mutationen auf das Bindungsverhalten von [ $^3\text{H}$ ]P1075 bzw. Pinacidil zu untersuchen, wurden weitere Bindungsexperimente durchgeführt: Die Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 gegen nicht-markiertes Pinacidil. Diese Radioligandbindungsstudien ergaben, dass die Affinitäten für Pinacidil und die Hill-Koeffizienten der Rezeptor-Mutanten in guter Übereinstimmung mit der Chimäre I<sub>Y1205A</sub> waren (Tab. 2 und Abb. 26). Ein Einfluss auf den EC<sub>50</sub> für die MgATP-induzierte Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 konnte damit ausgeschlossen werden.

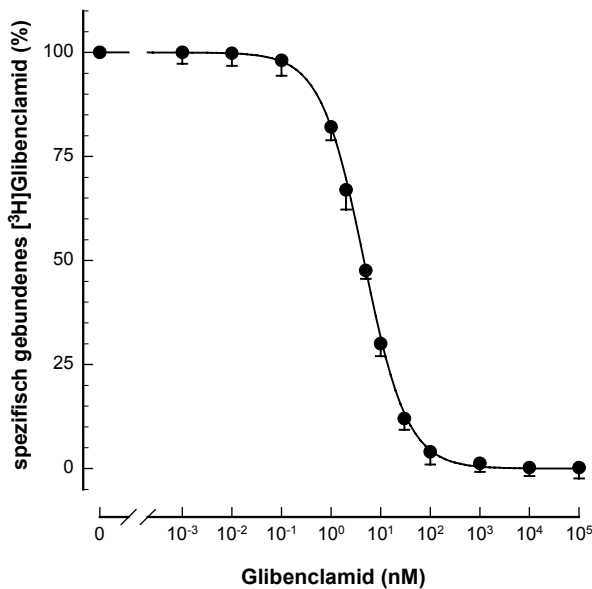
Durch die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs des SUR bleiben die Affinitäten für SUs wie Glibenclamid und KCOs wie [ $^3\text{H}$ ]P1075 bzw. Pinacidil unverändert. Diese Befunde stützen somit die Hypothese, dass die NBFs nicht direkt an der Ausbildung der Bindungsstellen für SUs und KCOs beteiligt sind (UHDE et al., 1999). Darüber hinaus sind die Ergebnisse weiteres Indiz dafür, dass sich eine Hemmung der hydrolytischen Aktivität in NBF1 stärker auf die Funktion des SUR auswirkt, als eine Hemmung in NBF2.



**A**

Mutation in NBF2	IC <sub>50</sub> [nM] Glibenclamid	Hill- Koeffizient	Mutation in NBF1	IC <sub>50</sub> [nM] Glibenclamid	Hill- Koeffizient
<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	4,6 ± 0,2	(-0,99)	<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	4,6 ± 0,2	(-0,99)
Y1317S	4,6 ± 0,2	(-1,04)	F675S	5,1 ± 0,2	(-1,03)
Y1317R	4,6 ± 0,3	(-0,94)	F675R	4,8 ± 0,1	(-1,01)
Y1317L	5,7 ± 0,4	(-0,93)	F675L	3,4 ± 0,4	(-0,94)
Y1317D	4,7 ± 0,2	(-1,03)	F675D	4,6 ± 0,2	(-0,98)
Y1317P	4,9 ± 0,1	(-0,98)	F675P	4,9 ± 0,2	(-0,96)
Y1317-	4,0 ± 0,3	(-0,99)	F675-	5,3 ± 0,4	(-1,04)
Q1390E	4,6 ± 0,2	(-0,97)	Q753E	5,9 ± 0,4	(-0,96)
S1446F	3,8 ± 0,3	(-0,93)	S809F	3,5 ± 0,2	(-1,06)
G1448I	5,1 ± 0,3	(-1,01)	G811I	4,0 ± 0,3	(-1,04)
D1469E	4,7 ± 0,2	(-0,96)	D832E	5,1 ± 0,4	(-0,97)
E1470K	5,3 ± 0,4	(-0,95)	D833K	5,4 ± 0,3	(-0,98)
D1476R	5,6 ± 0,5	(-1,03)	D839R	3,8 ± 0,1	(-0,99)
H1504E	4,9 ± 0,2	(-0,98)	H867E	4,3 ± 0,2	(-0,99)

**B**

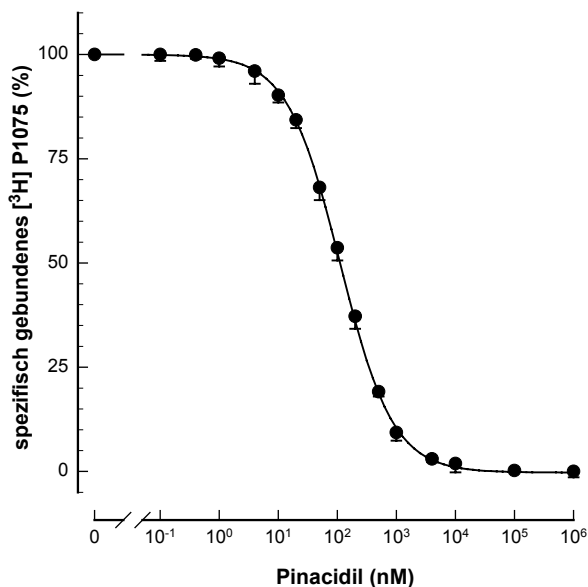


**Tab. 1** und **Abb. 25** Einfluss der Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs auf die Affinität für die Bindung von Glibenclamid. **A** Nach transienter Expression in COS1-Zellen und Präparation der Membranrezeptoren wurde in Verdrängungsbindungs-experimenten die Affinität für die Bindung von Glibenclamid ermittelt. Für die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> und jede der aufgeführten Mutationen in dieser Chimäre wurden komplette Verdrängungsbindungskurven erstellt (exemplarisch ist unter **B** die Verdrängung von [3H]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid an Chimäre I<sub>Y1205A</sub> dargestellt). Die Inkubationsansätze enthielten 0,3 nM [3H]Glibenclamid und steigende Konzentrationen an nicht

markiertem Glibenclamid. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von COS1-Membranen gestartet und nach 60 Minuten durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Aus den resultierenden Bindungskurven aus N=3-5 unabhängigen Einzelexperimenten wurden die halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen bzw. Hill-Koeffizienten errechnet und tabellarisch als Mittelwerte ± SEM angegeben. Homologe Mutationen in NBF2 und NBF1 stehen dabei jeweils in der gleichen Zeile der Tabelle.

**A**

Mutation in NBF2	IC <sub>50</sub> [μM] Pinacidil	Hill- Koeffizient	Mutation in NBF1	IC <sub>50</sub> [μM] Pinacidil	Hill- Koeffizient
<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	0,11 ± 0,1	(-0,97)	<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	0,11 ± 0,1	(-0,97)
Y1317S	0,15 ± 0,4	(-0,93)	F675S	n.d.	n.d.
Y1317R	0,14 ± 0,3	(-0,99)	F675R	0,14 ± 0,2	(-1,03)
Y1317L	0,16 ± 0,2	(-0,97)	F675L	n.d.	n.d.
Y1317D	0,14 ± 0,1	(-0,96)	F675D	n.d.	n.d.
Y1317P	0,10 ± 0,2	(-1,06)	F675P	n.d.	n.d.
Y1317-	0,13 ± 0,1	(-1,04)	F675-	n.d.	n.d.
Q1390E	0,11 ± 0,3	(-0,97)	Q753E	0,13 ± 0,2	(-0,96)
S1446F	n.d.	n.d.	S809F	n.d.	n.d.
G1448I	n.d.	n.d.	G811I	n.d.	n.d.
D1469E	n.d.	n.d.	D832E	n.d.	n.d.
E1470K	0,10 ± 0,3	(-1,01)	D833K	n.d.	n.d.
D1476R	n.d.	n.d.	D839R	n.d.	n.d.
H1504E	0,10 ± 0,1	(-0,94)	H867E	n.d.	n.d.

**B**

**Tab. 2 und Abb. 26 Einfluss der Mutationen hochkonservierter Aminosäuren in den NBFs auf die Affinität für die Bindung von Pinacidil.** **A** Nach transienter Expression in COS1-Zellen und Präparation der Membranrezeptoren wurde die Affinität für die Bindung von Pinacidil in Verdrängungsbindungsexperimenten ermittelt. Für die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> und jede der aufgeführten Mutanten in dieser Chimäre wurden komplette Verdrängungsbindungskurven erstellt (exemplarisch ist unter **B** die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch nicht-markiertes Pinacidil an Chimäre I<sub>Y1205A</sub> dargestellt). Die Inkubationsansätze enthielten 3 nM [<sup>3</sup>H]P1075, einen 5 mM Magnesium-Komplex von ATP, 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> und steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Pinacidil. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von COS1-Membranen gestartet und nach 60 Minuten durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Aus den resultierenden Bindungskurven aus N = 3-5 unabhängigen Einzelerperimenten wurden die halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen bzw. Hill-Koeffizienten errechnet und tabellarisch als Mittelwerte ± SEM angegeben. Homologe Mutationen in NBF2 und NBF1 stehen jeweils in der gleichen Zeile der Tabelle. Die Pinacidil-Affinität der Substitutionen S1446F, G1448I, D1469E und D1476R in NBF2 bzw. aller homologen Substitutionen in NBF1 mit Ausnahme von F675R und Q753E konnte nicht bestimmt werden (n.d.; s.a. 4.2.3 und 4.2.4).

Die Inkubationen wurden durch Zugabe von COS1-Membranen gestartet und nach 60 Minuten durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Aus den resultierenden Bindungskurven aus N = 3-5 unabhängigen Einzelerperimenten wurden die halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen bzw. Hill-Koeffizienten errechnet und tabellarisch als Mittelwerte ± SEM angegeben. Homologe Mutationen in NBF2 und NBF1 stehen jeweils in der gleichen Zeile der Tabelle. Die Pinacidil-Affinität der Substitutionen S1446F, G1448I, D1469E und D1476R in NBF2 bzw. aller homologen Substitutionen in NBF1 mit Ausnahme von F675R und Q753E konnte nicht bestimmt werden (n.d.; s.a. 4.2.3 und 4.2.4).

### 4.3 HI-analoge Mutationen in den NBFs des SUR2A

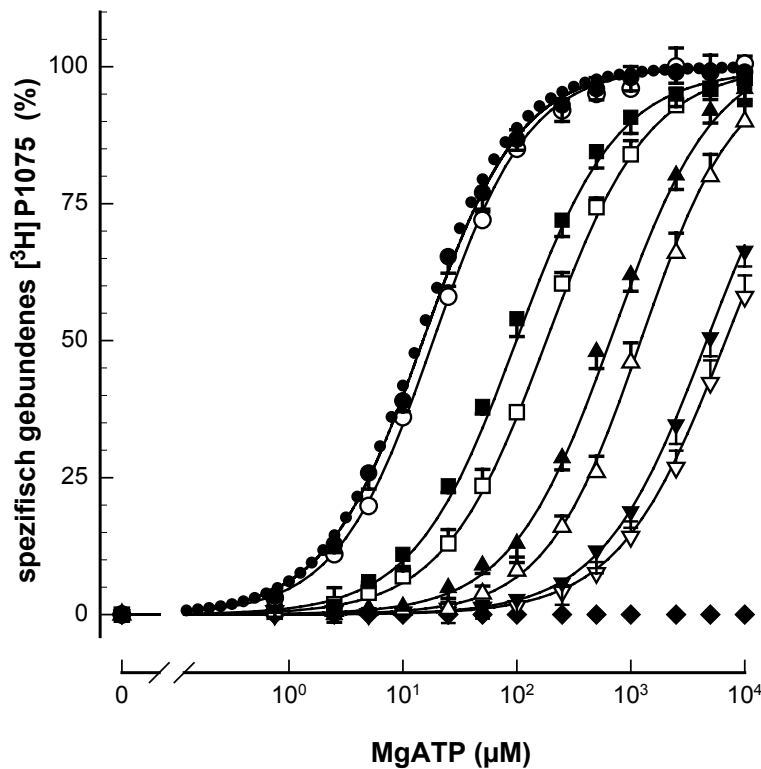
Um ein noch differenzierteres Bild über die Funktion der NBFs zu erhalten, wurden in Analogie zu bekannten HI-induzierenden Mutationen Punktmutationen in die NBFs des SUR2A eingebracht und ihre Auswirkungen auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 im Vergleich zu den homologen Mutationen in NBF1 untersucht. Dazu wurden zunächst die Positionen von Aminosäuren, die in SUR1 mit HI assoziiert sind, auf die NBF2 des SUR2A übertragen (Tab. 3) und vergleichend zu den Positionen in NBF1 des SUR2A untersucht.

HI-Mutation in NBF2 des SUR1	HI-analoge Mutation in NBF2 des SUR2A	HI-analoge Mutation in NBF1 des SUR2A
R1353P	R1316P	Y674P
V1361M	V1324M	T683M
G1379R	G1342R	G701R
G1382R	G1345R	G704R
S1387F	S1350F	S709F
F1388-	L1351-	L710-
R1394H	R1357H	G716H
R1419C	R1382C	R745C
R1421C	R1384C	S747C
R1437Q	R1400Q	E763Q
G1479R	G1442R	G805R
R1494W	R1457W	R820W
D1507K	E1470K	D833K
A1508+	A1471+	P834+

**Tab. 3** HI-analoge Substitutionen, Insertionen und Deletionen in den NBFs des SUR2A. Spalte eins der Abbildung zeigt HI-Mutationen in der NBF2 des SUR1. In Spalte zwei und drei sind die zur NBF2 des SUR1 homologen Mutationen in NBF2 und NBF1 des SUR2A dargestellt. Die Berechnung der entsprechenden Positionen wurde nach der Cluster-Methode in einem Multiple Alignment mit Hilfe des ClustalX durchgeführt (3.9).

#### 4.3.1 Substitution HI-analoger Aminosäuren in den NBFs des SUR2A

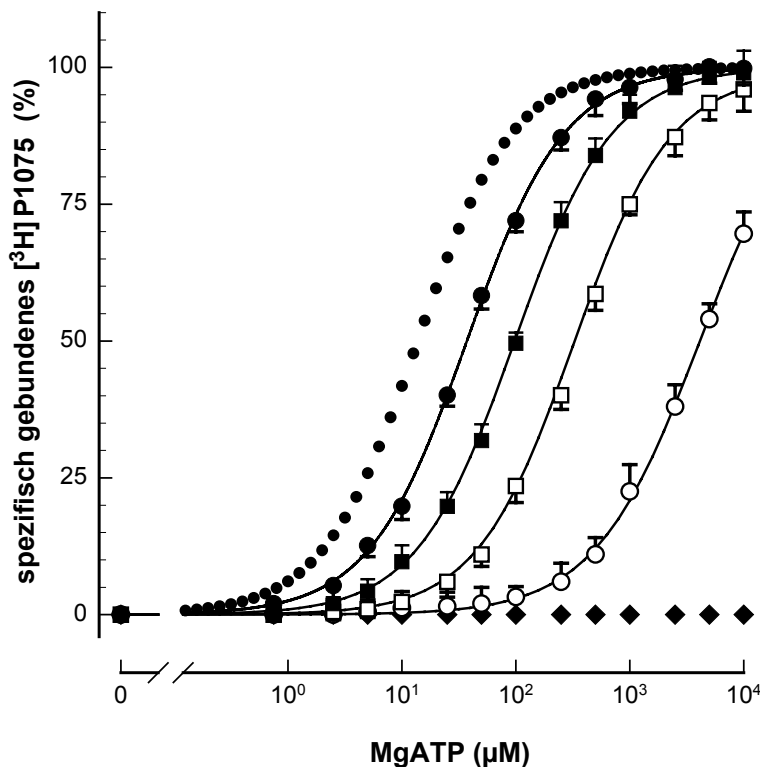
Übereinstimmend zu den Befunden der hochkonservierten Aminosäuren (s. 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6 und 4.2.7) zeigte sich für die HI-analogen Mutationen, dass sie sowohl in NBF2 (Abb. 27) als auch in NBF1 (Abb. 28) entweder zu einer Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP führten oder zu einem kompletten Verlust der ATP-induzierten Bindung von  $[^3H]P1075$ .



**Abb. 27** Einfluss HI-analoger Mutationen in der NBF2 von SUR2A auf die MgATP-induzierte Bindung von  $[^3H]P1075$ . Die Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$  durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $Mg^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> bzw. Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in dieser Chimäre exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der

Kurvenparameter entsprechen den Angaben der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelexperimenten: (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $14 \pm 2 \mu M$  (1,01), (●) R1384C in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $15 \pm 2 \mu M$  (1,01), (○) R1400Q in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $18 \pm 3 \mu M$  (1,06), (■) R1357H in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $95 \pm 4 \mu M$  (0,96), (□) G1442R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,18 \pm 0,02 mM$  (0,97), (▲) G1345R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,69 \pm 0,05 mM$  (0,98), (△) R1316P in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $1,2 \pm 0,2 mM$  (1,03), (▼) die Insertion A1471+ in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $4,6 \pm 0,3 mM$  (0,99) und (▽) E1470K in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $6,3 \pm 0,3 mM$  (0,96). (◆) Zwei weitere HI-analoge Mutationen: G1342R, R1457W und die Deletion L1351- in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> führten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von  $[^3H]P1075$ .

Die Substitution des Arginins in Pos. 1384 gegen Cystein und des Arginins in Pos. 1400 gegen Glutamin mit  $EC_{50}$ -Werten von 15 bzw. 18  $\mu$ M induzierten jeweils nur eine geringfügige Änderung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Bindung des [ $^3$ H]P1075 durch MgATP. Die Austausch des Arginins in Pos. 1357 gegen Histidin und Glycins in Pos. 1442 bzw. 1345 gegen Arginin führten hingegen zu klaren Rechtsverschiebungen des  $EC_{50}$  auf 95  $\mu$ M, 0,18 mM und 0,69 mM. Dem Austausch des Arginins in Pos. 1316 gegen Prolin, der Insertion des Alanins in Pos. 1471 und der Substitution des Glutamats in Pos. 1470 gegen Lysin folgte je eine deutliche Änderung des  $EC_{50}$  auf 1,2 mM, 4,6 mM und 6,3 mM MgATP. Weitere HI-analoge Mutationen: G1342R, R1457W und die Deletion L1351- zeigten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP einen kompletten Verlust der Bindung.



**Abb. 28** Einfluss HI-analoger Mutationen in der NBF1 von SUR2A auf die MgATP-induzierte Bindung von [ $^3$ H]P1075. Die Induktion der Bindung von [ $^3$ H]P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $Mg^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> bzw. Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in dieser Chimäre exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kur-

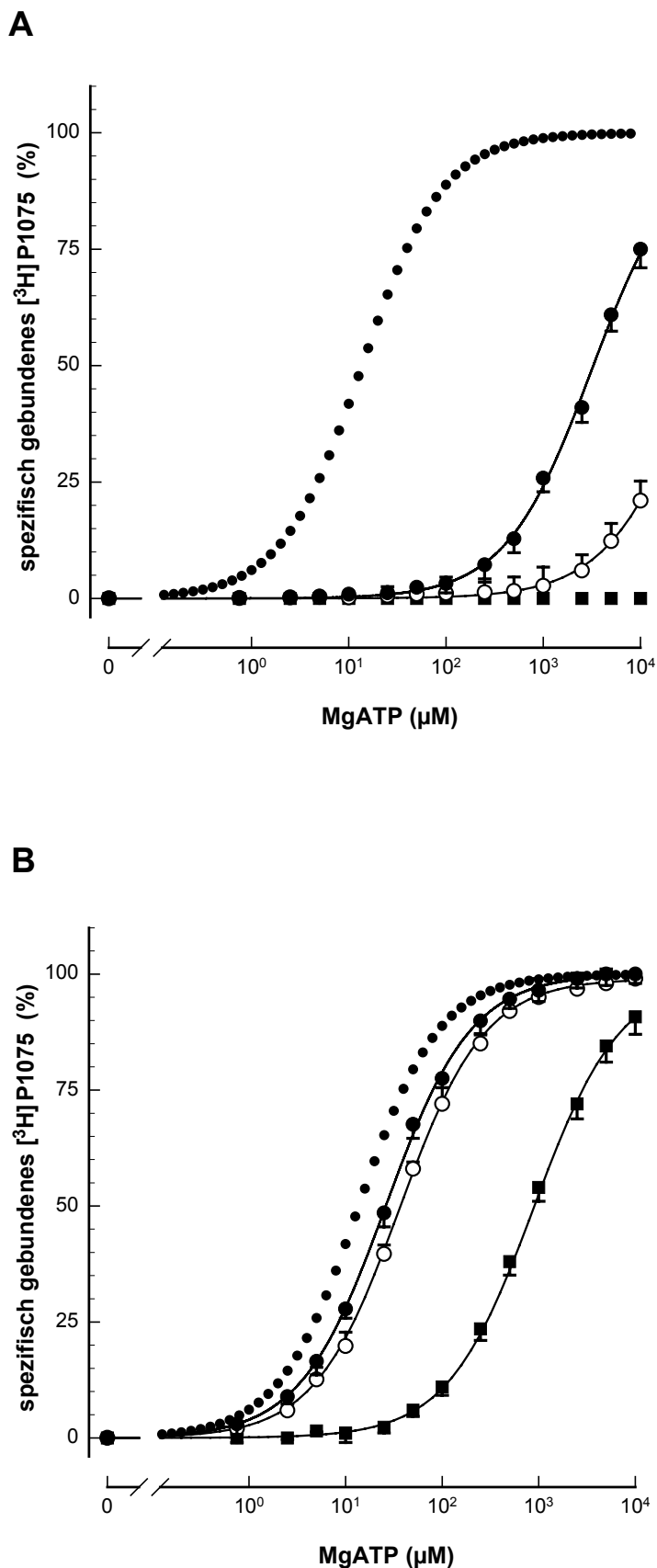
venparameter entsprechen den Angaben der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $EC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus N = 4-7 unabhängigen Einzelexperimenten: (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $14 \pm 2$   $\mu$ M (1,01) und (●) S747C in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $37 \pm 3$   $\mu$ M (1,00), (■) G716H in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $97 \pm 4$   $\mu$ M (1,01), (□) G805R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $0,32 \pm 0,02$  mM (1,02), (○) E763Q in Chimäre I<sub>Y1205A</sub>  $4,1 \pm 0,2$  mM (0,96). (◆) Weitere zur NBF2 homologe HI-analoge Mutationen: Y674P, G701R, G704R, R820W, D833K, die Deletion L710- und Insertion P834+ in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> führten bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3$ H]P1075.

Ebenfalls übereinstimmend mit den Experimenten zu den hochkonservierten Aminosäuren (s. 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6 und 4.2.7) zeigte sich dabei in der Regel, dass die Effekte auf den  $EC_{50}$  für MgATP zur Induktion der KCO-Bindung in NBF1 (Abb. 28) stärker ausgeprägt waren als in NBF2 (Abb. 27).

In NBF1 induzierten die Substitutionen des Serins in Pos. 747 gegen Cystein, des Glycins in Pos. 716 gegen Histidin, des Glycins in Pos. 805 gegen Arginin und Glutamats in Pos. 763 gegen Glutamin mit  $EC_{50}$ -Werten von 37 und 97  $\mu$ M bzw. 0,32 und 4,1 mM erwartungsgemäß jeweils eine deutlich stärkere Rechtsverschiebung als die entsprechenden Substitutionen in NBF2.

Bei vereinzelten Mutationen zeigte sich jedoch auch die gegensätzliche Tendenz. Hier war der Effekt auf den  $EC_{50}$  in NBF2 stärker ausgeprägt als in NBF1 oder es zeigte sich, dass eine deutliche Rechtsverschiebung in NBF1 einer kompletten Aufhebung der ATP-induzierten Bindung in NBF2 entsprach (Abb. 29). Die Substitutionen des Valins in Pos. 1324 gegen Methionin, des Serins in Pos. 1350 gegen Phenylalanin und Arginins in Pos. 1382 gegen Cystein in NBF2 zeigten  $EC_{50}$ -Werte von 3,1 mM und 41 mM bzw. einen vollständigen Verlust der Bindung von [ $^3$ H]P1075 bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP (Abb. 29 A), während die homologen Substitutionen in NBF1, Threonin in Pos. 683 gegen Methionin, Serin in Pos. 709 gegen Phenylalanin und Arginin in Pos. 745 gegen Cystein, jeweils nur zu Änderungen des  $EC_{50}$  von MgATP auf 26  $\mu$ M, 39  $\mu$ M und 0,89 mM führten (Abb. 29 B).

**Abb. 29** Einige HI-analoge Mutationen in NBF2 (A) von SUR2A zeigen einen stärkeren Effekt als die entsprechenden Mutationen in NBF1 (B). Die Induktion der Bindung von [ $^3$ H]P1075 durch steigende Konzentrationen von ATP und äquimolarem  $Mg^{2+}$  wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> bzw. Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in dieser Chimäre exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter entsprechen den Angaben der Abb. 18. Aus den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende EC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus N = 4-7 unabhängigen Einzelexperimenten: **A** (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 14 ± 2 μM (1,01), (●) V1324M in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 3,1 ± 0,2 mM (0,98) und (○) S1350F in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 41 ± 4 mM (0,96), (EC<sub>50</sub> aus dem Kurvenverlauf abgeschätzt, s. 3.8.5). (■) Die Mutation R1382C in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> führte bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3$ H]P1075. **B** (●●●) Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 14 ± 2 μM (1,01), (●) T683M in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 26 ± 2 μM (1,01), (○) S709F in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 39 ± 3 μM (1,02) und (■) R745C in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> 0,89 ± 0,04 mM (0,99).



### 4.3.2 HI-analoge Mutationen in den NBFs des SUR führen nicht zu Änderungen der Affinitäten für SUs und KCOs

Konform zu den Ergebnissen der Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren führten zahlreiche HI-analoge Mutationen in den NBFs des SUR2A entweder zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 oder zu einer deutlichen Rechtsverschiebung des  $\text{EC}_{50}$  für MgATP zur Induktion der Bindung. Ein Einfluss der Mutationen auf die Affinitäten für SUs wie Glibenclamid (Tab. 4) und KCOs wie Pinacidil (Tab. 5) konnte hierbei durch Kontroll-experimente erneut ausgeschlossen werden (s.a. 4.2.8).

Mutation in NBF2	$\text{IC}_{50}$ [nM] Glibenclamid	Hill- Koeffizient	Mutation in NBF1	$\text{IC}_{50}$ [nM] Glibenclamid	Hill- Koeffizient
<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	$4,6 \pm 0,2$	(-0,99)	<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	$4,6 \pm 0,2$	(-0,99)
R1316P	$3,4 \pm 0,3$	(-0,95)	Y674P	$5,5 \pm 0,6$	(-0,94)
V1324M	$3,1 \pm 0,5$	(-0,94)	T683M	$4,5 \pm 0,1$	(-0,98)
G1342R	$5,6 \pm 0,4$	(-0,95)	G701R	$3,7 \pm 0,5$	(-0,94)
G1345R	$4,2 \pm 0,1$	(-1,04)	G704R	$3,3 \pm 0,2$	(-0,98)
S1350F	$3,9 \pm 0,2$	(-0,98)	S709F	$5,0 \pm 0,3$	(-1,01)
L1351-	$3,4 \pm 0,6$	(-0,99)	L710-	n.d.	n.d.
R1357H	$3,5 \pm 0,2$	(-0,97)	G716H	$3,4 \pm 0,4$	(-0,96)
R1382C	$5,1 \pm 0,2$	(-0,94)	R745C	$3,5 \pm 0,3$	(-1,01)
R1384C	$5,2 \pm 0,3$	(-1,03)	S747C	$5,6 \pm 0,3$	(-1,06)
R1400Q	$4,3 \pm 0,2$	(-0,97)	E763Q	$3,6 \pm 0,4$	(-0,91)
G1442R	$5,6 \pm 0,4$	(-1,03)	G805R	$5,3 \pm 0,1$	(-0,94)
R1457W	$5,3 \pm 0,2$	(-1,01)	R820W	$4,9 \pm 0,2$	(-1,00)
E1470K	$5,3 \pm 0,4$	(-0,95)	D833K	$5,4 \pm 0,3$	(-0,98)
A1471+	$4,6 \pm 0,6$	(-1,05)	P834+	$5,3 \pm 0,4$	(-1,03)

**Tab. 4** Affinität von Glibenclamid für die Bindung an die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> mit einzelnen HI-analogenen Mutationen, Deletionen oder Insertionen. Nach transienter Expression in COS1-Zellen und Präparation der Membranrezeptoren wurde in Verdrängungsbindungsexperimenten die Affinität für die Bindung von Glibenclamid ermittelt. Für die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> und jede der aufgeführten Mutanten in dieser Chimäre wurden komplette Verdrängungsbindungskurven erstellt (s.a. Tab. 1 und Abb. 25). Die Inkubationsansätze enthielten 0,3 nM [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid und steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Glibenclamid. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von COS1-Membranen gestartet und nach 60 Minuten durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Aus den resultierenden Bindungskurven aus N = 3-5 unabhängigen Einzel-experimenten wurden die halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen bzw. Hill-Koeffizienten errechnet und tabellarisch als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben. Homologe Mutationen in NBF2 und NBF1 stehen dabei jeweils in der gleichen Zeile der Tabelle. E1470 in NBF2 bzw. D833 in NBF1 sind sowohl hochkonservierte Aminosäuren (s.a. Tab. 1) als auch Positionen HI-analoger Mutationen. Die Glibenclamid-Affinität der Deletion L710- in NBF1 konnte nicht bestimmt werden (n.d., s.a. Text).



Mutation in NBF2	IC <sub>50</sub> [μM] Pinacidil	Hill- Koeffizient	Mutation in NBF1	IC <sub>50</sub> [μM] Pinacidil	Hill- Koeffizient
<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	0,11 ± 0,1	(-0,97)	<b>Chimäre I<sub>YA</sub></b>	0,11 ± 0,1	(-0,97)
R1316P	0,10 ± 0,1	(-0,93)	Y674P	n.d.	n.d.
V1324M	0,10 ± 0,2	(-1,05)	T683M	0,10 ± 0,1	(-1,03)
G1342R	n.d.	n.d.	G701R	n.d.	n.d.
G1345R	0,10 ± 0,1	(-1,10)	G704R	n.d.	n.d.
S1350F	0,11 ± 0,1	(-0,96)	S709F	0,11 ± 0,3	(-0,94)
L1351-	n.d.	n.d.	L710-	n.d.	n.d.
R1357H	0,15 ± 0,3	(-0,98)	G716H	0,11 ± 0,1	(-0,96)
R1382C	n.d.	n.d.	R745C	0,10 ± 0,2	(-1,01)
R1384C	0,11 ± 0,1	(-1,00)	S747C	0,14 ± 0,2	(-1,06)
R1400Q	0,16 ± 0,2	(-0,95)	E763Q	0,16 ± 0,3	(-0,95)
G1442R	0,18 ± 0,4	(-0,99)	G805R	0,11 ± 0,3	(-1,02)
R1457W	n.d.	n.d.	R820W	n.d.	n.d.
E1470K	0,10 ± 0,3	(-1,01)	D833K	n.d.	n.d.
A1471+	0,12 ± 0,2	(-1,02)	P834+	n.d.	n.d.

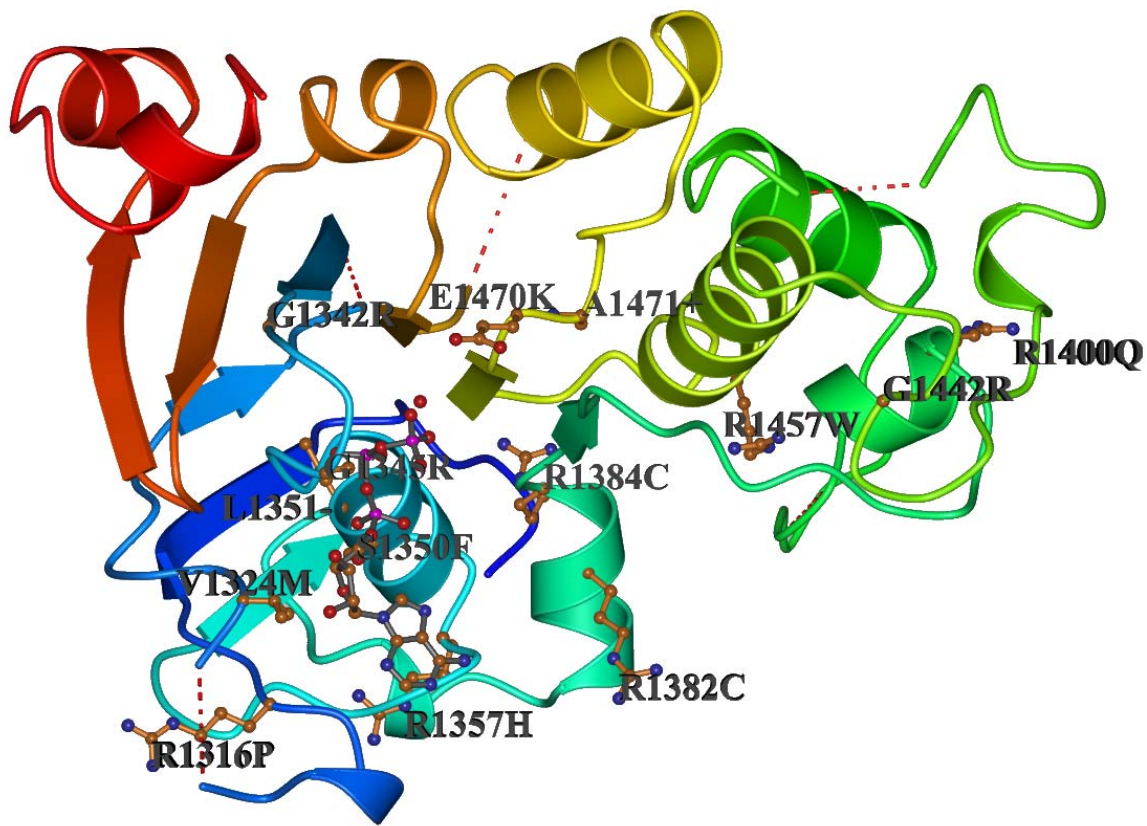
**Tab. 5** Affinität von Pinacidil für die Bindung an die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> mit einzelnen HI-analogen Mutationen, Deletionen oder Insertionen. Nach transienter Expression in COS1-Zellen und Präparation der Membranrezeptoren wurde in Verdrängungsbindungsexperimenten die Affinität für die Bindung von Pinacidil ermittelt. Für die Chimäre I<sub>Y1205A</sub> und jede der aufgeführten Mutanten in dieser Chimäre wurden komplette Verdrängungsbindungskurven erstellt (s.a. Tab. 2 und Abb. 26). Die Inkubationsansätze enthielten 3 nM [<sup>3</sup>H]P1075, einen 5 mM Magnesium-Komplex von ATP, 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> und steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Pinacidil. Die Inkubationen wurden durch Zugabe von COS1-Membranen gestartet und nach 60 Minuten durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Aus den resultierenden Bindungskurven aus N = 3-5 unabhängigen Einzelerperimenten wurden die halbmaximal inhibitorischen Konzentrationen bzw. Hill-Koeffizienten errechnet und tabellarisch als Mittelwerte ± SEM angegeben. Homologe Mutationen in NBF2 und NBF1 stehen dabei jeweils in der gleichen Zeile der Tabelle. E1470 in NBF2 bzw. D833 in NBF1 sind sowohl hochkonservierte Aminosäuren (s.a. Tab. 2) als auch Positionen HI-analoger Mutationen. Die Pinacidil-Affinität der Substitutionen G1342R, R1382C, R1457W und der Deletion L1351- in NBF2 bzw. der Substitutionen Y674P, G701R, G704R, R820W und D833K, der Deletion L710- und Insertion P834+ in NBF1 konnte nicht bestimmt werden (n.d., s.a. Text und 4.3.1).

Alle Mutationen, die eine Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 ermöglichten, zeigten zur Chimäre I<sub>Y1205A</sub> vergleichbare Affinitäten für die Bindung des nicht-markierten Pinacidils. Darüber hinaus konnte für alle Mutationen eine nahezu identische Affinität für Glibenclamid detektiert werden. Ausnahme davon bildete lediglich die Deletion des Leucins in Pos. 710, die neben einem kompletten Verlust der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 ebenfalls keine Bindung von

Glibenclamid zeigte. Ein Befund, der z.B. mit einer fehlerhaften Faltung des Membranproteins oder Transportdefekten erklärt werden könnte.

#### 4.3.3 Lokalisierung HI-analoger Mutationen in den NBFs des SUR2A

Zur Analyse der strukturellen und funktionellen Relevanz der HI-analogen Mutationen in den NBFs des SUR2A, wurde die Lokalisierung der Aminosäure-Reste berechnet (s. 3.9 und 3.10) und in den Modellen der Tertiärstrukturen von NBF2 (Abb. 30) und NBF1 (Abb. 31) dargestellt.



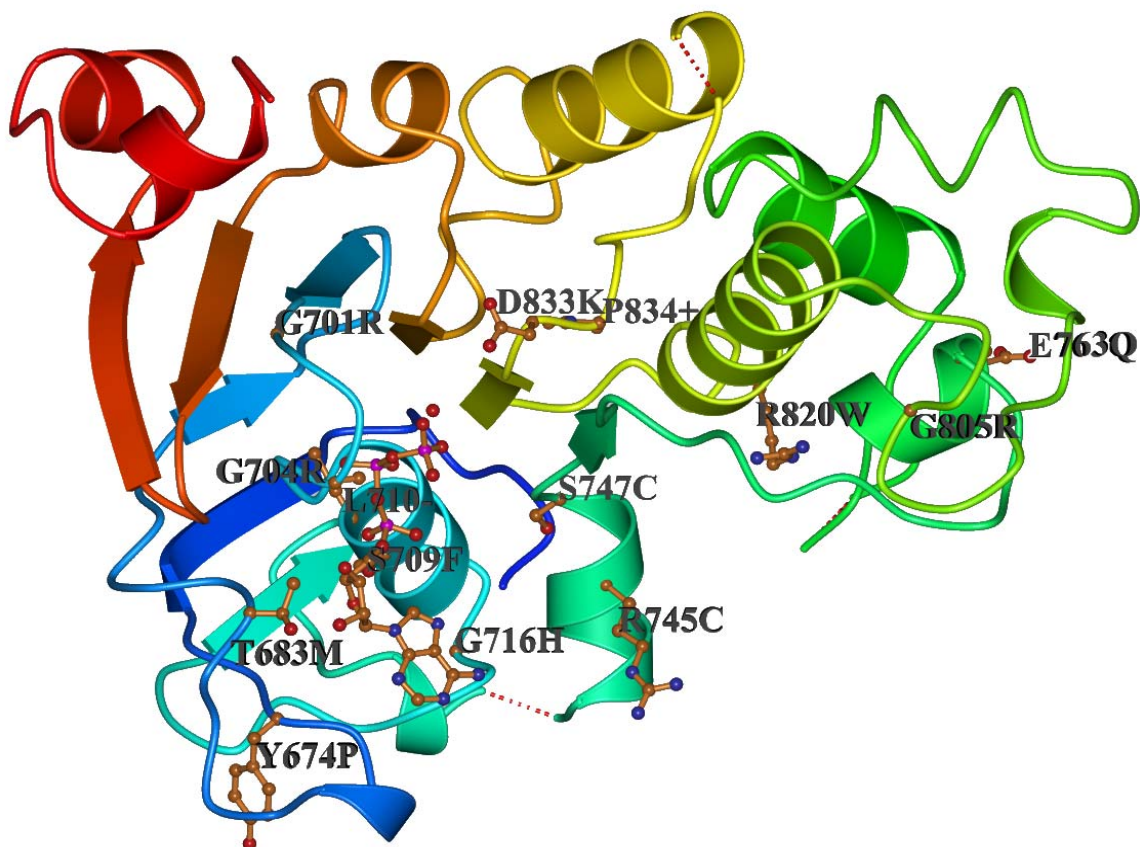
**Abb. 30** HI-analoge Mutationen in NBF2 des SUR2A. Diese Abbildung zeigt die Lokalisierung HI-analoger Substitutionen, Insertionen und Deletionen in NBF2 des SUR2A. Im humanen SUR1 sind diese Aminosäuren mit HI kausal assoziiert (weitere Details: siehe Abb. 15).

Die Aminosäuren R1316 bzw. Y674, V1324 bzw. T683, G1345 bzw. G704, S1350 bzw. S709, L1351 bzw. L710 und R1357 bzw. G716 sind in den Strukturmodellen der NBFs in unmittelbarer Nähe des ATP-Moleküls in der Nukleotid-bindenden Tasche lokalisiert. Die Arginin-Reste in den Positionen 1382 bzw. 745, 1400 bzw. das Glutamat in Position 763 und R1457 bzw. 820 befinden sich jeweils ebenso wie auch das Glycin in Position 1442 bzw. 805

in strukturell kritischen Positionen für helikale Strukturen bzw. inmitten der sog. Linker-Region. In enger räumlicher Distanz zum Walker B Motiv bzw. zu dem für die Hydrolyse des Nukleotids essentiellen Magnesium-Kations sind weitere Reste: G1342 bzw. 701, R1384 bzw. S747, E1470 bzw. D833 und A1471 bzw. P834 lokalisiert (s.a. 4.1.3.2).

Eine Substitution, Deletion oder Insertion dieser HI-analogen Aminosäuren führte i.A. trotz unveränderter Affinität von Glibenclamid (Tab. 4) und Pinacidil (Tab. 5) entweder zu einer Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP zur Induktion der Bindung von [ $^3H$ ]P1075 oder zu einem kompletten Verlust der Bindung (s. 4.3.1).

Diese Ergebnisse stützen damit die Annahme, dass diese Aminosäuren kritische Bedeutung für die Stabilisierung des Nukleotids besitzen oder an der Transduktion einer Konformationsänderung der ATP-bindenden Domäne beteiligt sind. (Zur Diskussion der Ergebnisse siehe: 5.4.3).



**Abb. 31** HI-analoge Mutationen in NBF1 des SUR2A. Diese Abbildung zeigt die den HI-analogen Mutationen in NBF2 (Abb. 30) entsprechenden Substitutionen, Insertionen und Deletionen in NBF1 des SUR2A (weitere Details: siehe Abb. 15).

#### **4.4 Molekulare Determinanten der allosterischen Interaktion zwischen den Bindungsstellen für SUs und KCOs**

##### **4.4.1 Einführung**

Sulfonylharnstoffe (SUs) und Kalium-Kanal-Öffner (KCOs) entfalten ihre Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal über Bindungsstellen (sites) auf dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR; 1.8.3; SCHWANSTECHEER et al., 1994; 1998). Diese sites sind in enger räumlicher Assoziation innerhalb der TMDII lokalisiert (1.8.3.1; 1.8.3.2), wobei die Bindungsstelle für SUs (SUBR) von zwei Bereichen (KCOI und KCOII) flankiert wird, die kritisch sind für die Bindung von KCOs (Abb. 8; UHDE et al., 1999; TOMAN, 2001). Auf den nativen Isoformen des SUR sind diese Bindungsstellen für SUs und KCOs negativ-allosterisch aneinander gekoppelt (1.8.3.3). So können einerseits an SUR1 SUs wie [ $^3H$ ]Glibenclamid durch KCOs negativ allosterisch verdrängt werden (SCHWANSTECHEER et al., 1998; der  $IC_{50}$  für die Verdrängung von Glibenclamid durch Diazoxid beträgt  $210 \pm 19 \mu M$ ), andererseits lassen sich an den SUR2-Isoformen KCOs wie [ $^3H$ ]P1075 durch SUs ebenfalls allosterisch verdrängen (DÖRSCHNER et al., 1999; die  $IC_{50}$ -Werte für die Verdrängung von [ $^3H$ ]P1075 durch Glibenclamid betragen  $0,36 \pm 0,05 \mu M$  für SUR2A bzw.  $0,33 \pm 0,04 \mu M$  für SUR2B).

Zur Klärung der molekularen Basis für die Interaktion der Bindungsstellen und Identifikation der - für die allosterische Wechselwirkung - essentiellen Bereiche wurden in der vorliegenden Arbeit systematisch Chimären konstruiert, somit kritische Regionen des Rezeptors durch korrespondierende Bereiche verschiedener SUR-Isoformen transferiert und in Radioligandbindungsexperimenten der Einfluss der Substitutionen auf die allosterische Kopplung analysiert. Untersuchungen zur wechselseitigen allosterischen Verdrängung von SUs und KCOs erfolgten an den SUR2-Isoformen des Rezeptors und an den auf SUR2 basierenden Chimären durch Verdrängung von [ $^3H$ ]P1075 durch Glibenclamid bzw. [ $^3H$ ]Glibenclamid durch Pinacidil. Davon abweichend wurde anstelle des Pinacidils zur Charakterisierung des SUR1 und einigen auf SUR1 basierenden Chimären Diazoxid eingesetzt, da es aus der Gruppe der KCOs die höchste Affinität für SUR1 besitzt (SCHWANSTECHEER et al., 1998; DÖRSCHNER, 2000).

#### 4.4.2      **Negativ-allosterische Kopplung der Bindungsstellen für SUs und KCOs wird über den C-Terminus und die SUBR vermittelt**

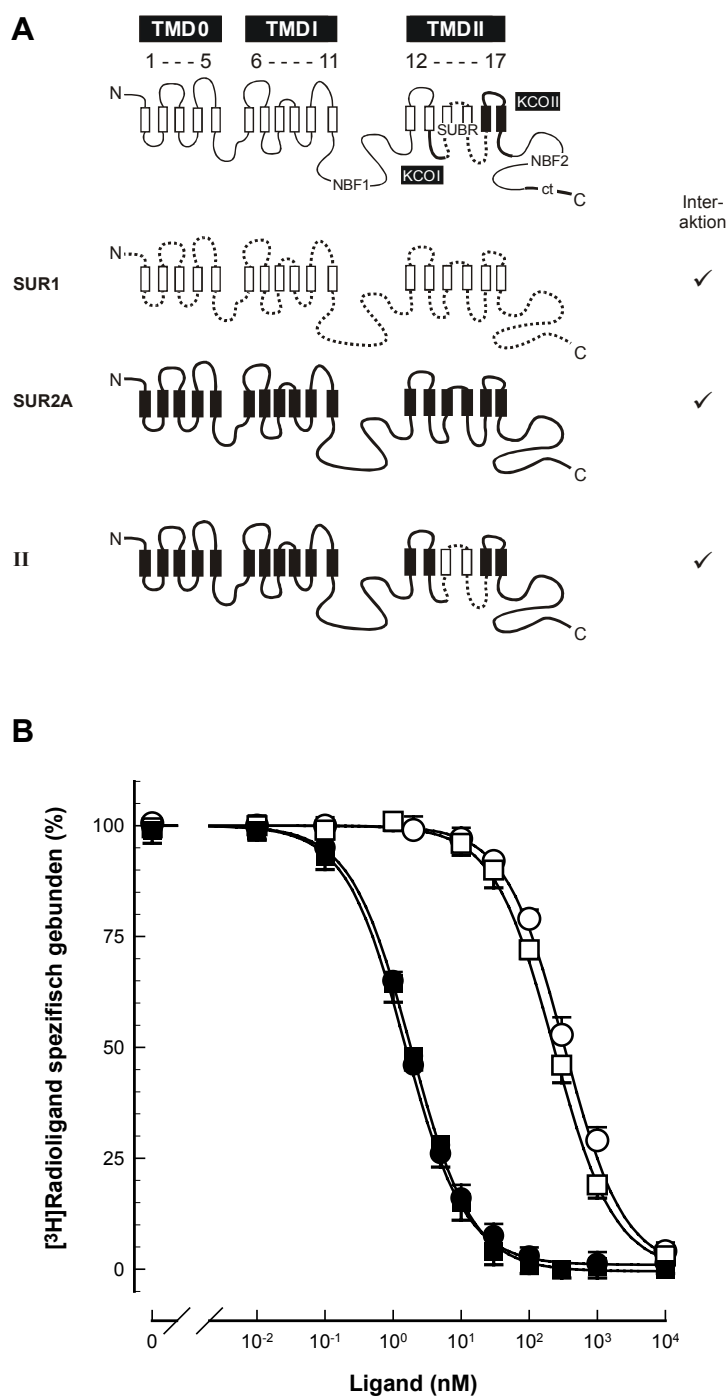
##### 4.4.2.1      ***Der C-Terminus des SUR ist kritisch für die allosterische Interaktion***

Da die Bindungsstellen für SUs und KCOs auf den physiologischen Isoformen des Sulfonylharnstoffrezeptors: SUR1, SUR2A und SUR2B strikt negativ-allosterisch gekoppelt sind (s.a. 1.8.3.3; 4.4.1), konnte die niederaffine Bindungsstelle für SUs auf den SUR2-Isoformen durch Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 (DÖRSCHNER et al., 1999) bzw. die niederaffine site für KCOs auf dem SUR1 durch Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid (SCHWANSTECHEER et al., 1998) indirekt charakterisiert werden. Ein Transfer der SUBR von SUR1 auf SUR2A generierte jedoch eine Chimäre (Chimäre II; UHDE et al., 1999), die anders als die physiologischen Isoformen des Rezeptors beide Bindungsstellen für SUs und KCOs in hochaffiner Form besitzt (Abb. 32 A). Diese Chimäre erlaubt es, die wechselseitige Verdrängung direkt an einem Konstrukt zu analysieren. Die Charakterisierung der allosterischen Wechselwirkung ergab, dass sowohl KCOs durch SUs als auch SUs durch KCOs verdrängt werden konnten (Toman, 2001). Die Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid ergab eine halbmaximal-inhibitorische Konstante von  $1,6 \pm 0,2$  nM, die von Glibenclamid durch Pinacidil einen  $\text{IC}_{50}$  von  $0,36 \pm 0,04$   $\mu\text{M}$ . Die kompetitiven Verdrängungsexperimente führten mit  $0,23 \pm 0,03$   $\mu\text{M}$  für Pinacidil bzw.  $1,8 \pm 0,1$  nM für Glibenclamid zu nahezu identischen Werten. Der Transfer der SUBR von SUR1 in SUR2A führt also zu einer Chimäre mit hochaffinen Bindungsstellen für beide Liganden und intakter strikt negativ-allosterischer Interaktion (Abb. 32 B).

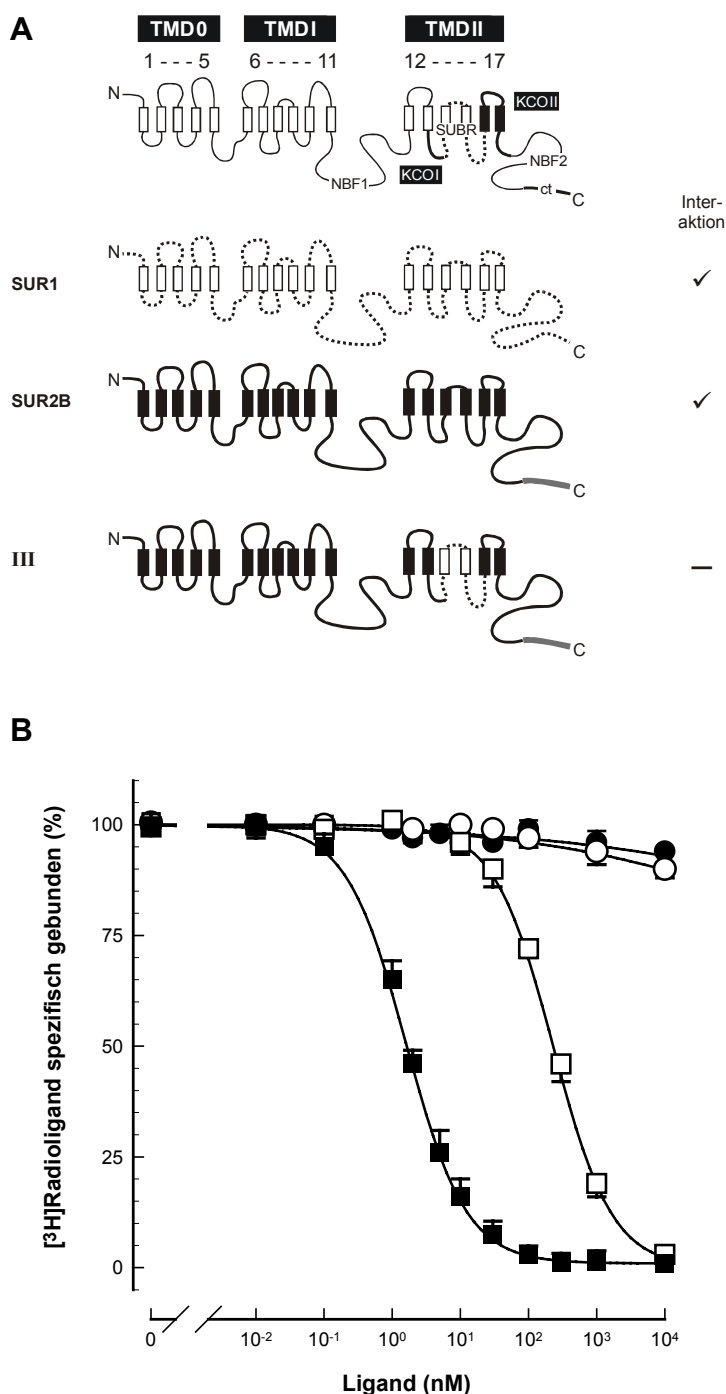
Überraschenderweise führte der analoge Transfer der SUBR von SUR1 in SUR2B (Chimäre III; Abb. 33 A) hingegen zu einem kompletten Verlust der allosterischen Wechselwirkung. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ließ sich weder [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid, noch [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch Pinacidil aus der Bindung verdrängen. Trotz der Aufhebung der allosterischen Kopplung der sites können auch an Chimäre III sowohl SUs als auch KCOs mit hoher Affinität an das Konstrukt binden. Analog zu Chimäre II ließ sich [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Pinacidil ( $\text{IC}_{50}$  bei  $0,22 \pm 0,04$   $\mu\text{M}$ ) und [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid ( $\text{IC}_{50}$  bei  $1,6 \pm 0,3$  nM) verdrängen (Abb. 33 B).

**Abb. 32** Transfer der SUBR des SUR1 in SUR2A erlaubt es, die wechselseitige Verdrängung an einem Konstrukt zu untersuchen. Teil **A** der Abbildung zeigt den Aufbau der Chimäre II. Eine intakte negativ-allosterische Wechselwirkung ist mit ✓ gekennzeichnet. Chimäre II: (1-1095 SUR2A)-(1129-1242 SUR1)-(1243-1545 SUR2A); UHDE et al., 2001. In Teil **B** sind die Verdrängungsbindungsexperimente an Chimäre II dargestellt. Die Untersuchungen zur wechselseitigen Kopplung der sites von KCOs und SUs wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre II exprimierten. Die Inkubationsansätze enthielten entweder 3 nM [<sup>3</sup>H]P1075 oder 0,3 nM [<sup>3</sup>H]Glibenclamid, 100 µM MgATP sowie 1 mM freies Mg<sup>2+</sup> in Trispuffer (200 mM, pH 7,4) und steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Glibenclamid oder Pinacidil. Alle Inkubationen wurden durch Zugabe von Membranen gestartet und durch Filtration nach 60 min gestoppt (s.a. 3.8.5). Die Ergebnisse aus N = 3-5 unabhängigen Einzelexperimenten sind dargestellt in Prozent der spezifischen Bindung des [<sup>3</sup>H]Radioliganden. Aus den

resultierenden Verdrängungsbindungskurven ergaben sich folgende IC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern): [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Glibenclamid (■) 1,8 ± 0,1 nM (-1,03); [<sup>3</sup>H]P1075 durch Glibenclamid (●) 1,6 ± 0,2 nM (-0,96); [<sup>3</sup>H]P1075 durch Pinacidil (□) 0,23 ± 0,03 µM (-0,98) und [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil (○) 0,36 ± 0,04 µM (-0,98).



**Abb. 33** *Analoger Transfer der SUBR des SUR1 in SUR2B führt zu komplettem Verlust der allosterischen Kopplung.* Teil **A** der Abbildung zeigt den Aufbau der Chimäre III. Eine intakte bzw. aufgehobene negativ-allosterische Wechselwirkung ist mit ✓ bzw. – gekennzeichnet. Chimäre III: (1-1095 SUR2B)-(1129-1242 SUR1)-(1243-1545 SUR2B); TOMAN, 2001. In Teil **B** sind die Verdrängungsbindungsexperimente an Chimäre III dargestellt. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter entsprechen den Angaben der Abb. 32. Aus den resultierenden Bindungskurven an Chimäre III ergaben sich folgende  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 3-5$  unabhängigen Einzelexperimenten: [ $^3H$ ]Glibenclamid durch Glibenclamid (■)  $1,6 \pm 0,3$  nM (-0,99) und [ $^3H$ ]P1075 durch Pinacidil (□)  $0,22 \pm 0,04$   $\mu$ M (-1,01). Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M ließ sich weder [ $^3H$ ]P1075 durch Glibenclamid (●) noch [ $^3H$ ]Glibenclamid durch Pinacidil (○) deutlich verdrängen.

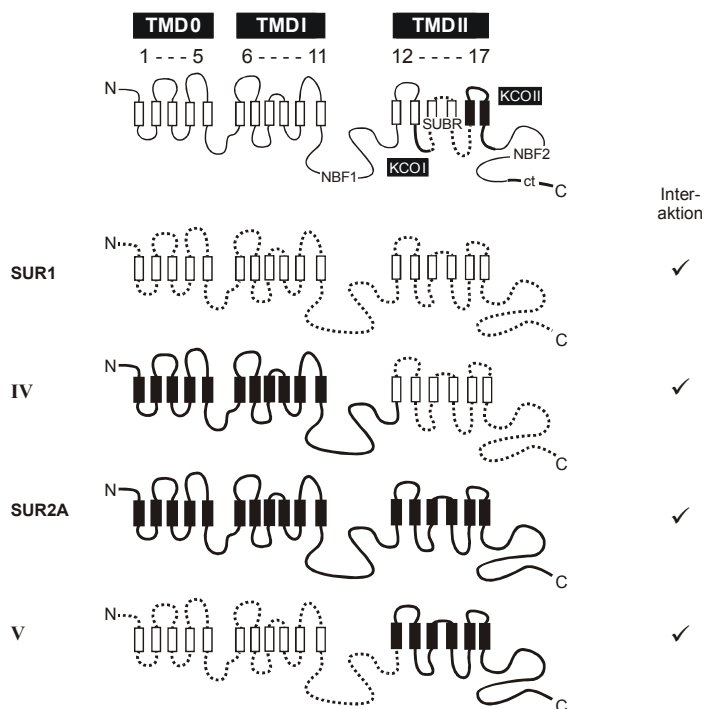


Chimäre II und Chimäre III differieren jedoch lediglich in den 42 C-terminalen Aminosäuren des SUR. Diese Ergebnisse sind klares Indiz dafür, dass der C-Terminus Schlüsselfunktion für die allosterische Kopplung der sites besitzt (s.a. TOMAN, 2001). Um Bereiche zu identifizieren, die neben dem C-Terminus für die negativ-allosterische Kopplung essentiell sind, wurden weitere Chimären konstruiert.



#### 4.4.2.2 Rolle von TMD0, TMDI und NBF1 für die Kopplung der sites

Sowohl von SUR1 als auch von SUR2A ausgehend, die je eine intakte Wechselwirkung der Bindungsstellen zeigten, wurden Chimären konstruiert, deren erste Hälfte des Rezeptors durch jene der anderen Isoform ausgetauscht wurde (Abb. 34). So wurde für die Chimäre IV die TMD0, TMDI als auch NBF1 durch die entsprechenden Bereiche des SUR2A ersetzt und für die Chimäre V die TMD0, TMDI und NBF1 durch die korrespondierenden Aminosäuren des SUR1 ausgetauscht. Die Untersuchungen zur wechselseitigen Verdrängung zeigten, dass der Transfer der entsprechenden N-terminalen Bereiche des SUR1 bzw. des SUR2A die negativ-allosterische Interaktion nicht beeinflusste. Diese Befunde sind Hinweis darauf, dass die N-terminalen Bereiche des SUR einschließlich der NBF1 für die negativ-allosterische Kopplung keine Bedeutung besitzen.



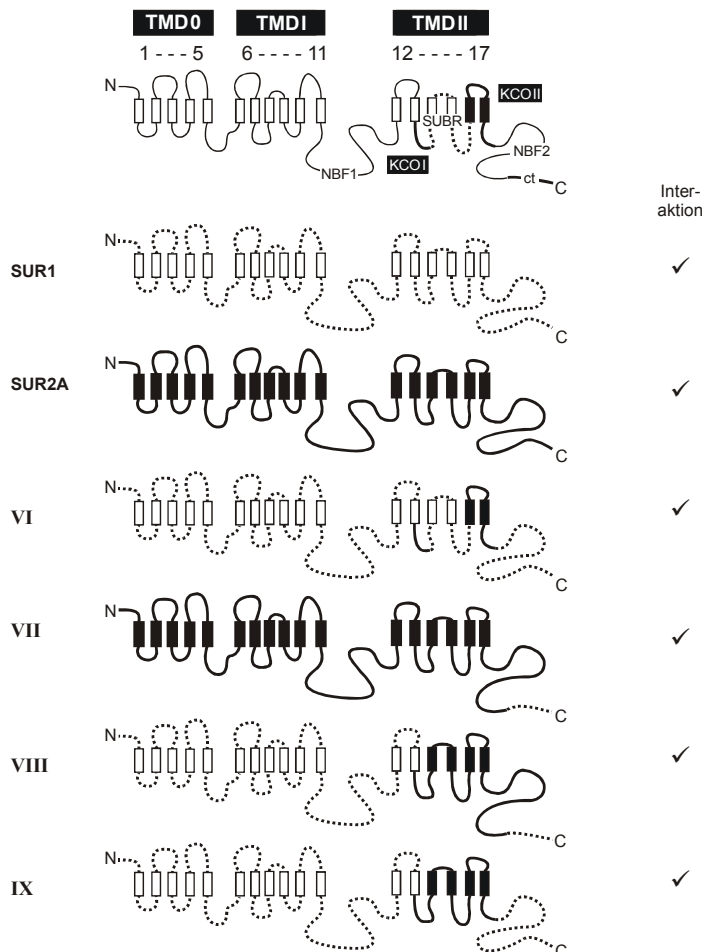
**Abb. 34** Rolle von TMD0, TMDI und NBF1 für die allosterische Kopplung. Die Experimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient SUR1, SUR2A, Chimäre IV und V exprimierten. Die Durchführung der Bindungsexperimente und Bestimmung der Kurvenparameter entsprechen den Angaben der Abb. 32. Die resultierenden Bindungskurven für die Chimären (nicht gezeigt) unterscheiden sich nicht signifikant von den Parametern für SUR1 und SUR2A. Eine intakte negativ-allosterische Wechselwirkung ist mit ✓ gekennzeichnet. Zusammensetzung der Chimären: IV (1-917 SUR2A)-(939-1582 SUR1); V (1-939 SUR1)-(917-1545 SUR2A).

#### 4.4.2.3 Rolle von KCOI, KCOII, TMR12 und TMR13 sowie NBF2 für die Kopplung der sites

Um innerhalb der TMDII die kritischen Regionen für die Interaktion der Bindungsstellen einzugrenzen, wurden zunächst die für die Bindung von KCOs essentiellen Bereiche (KCOI

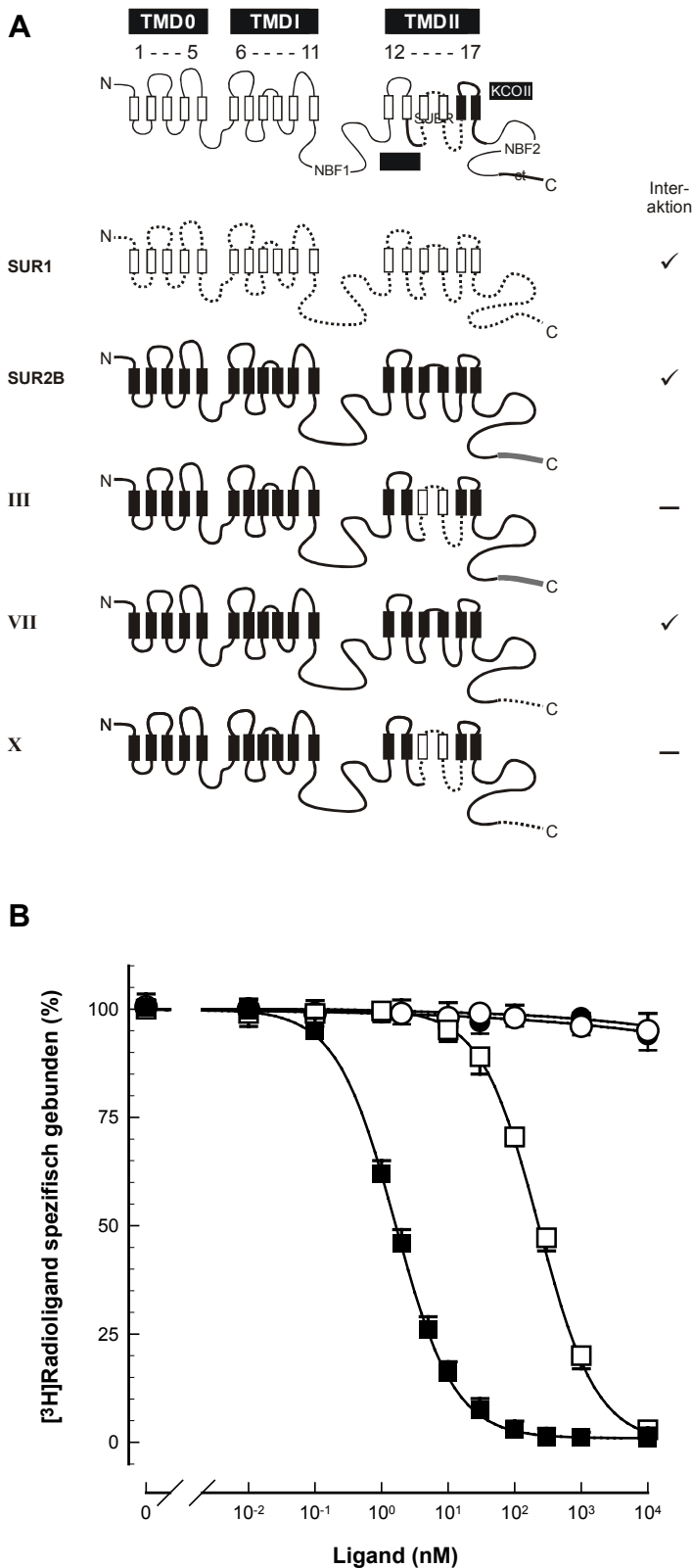


und KCOII) von SUR2A in SUR1 transferiert. Diese Austausche zeigten keinen Einfluss auf die negativ-allosterische Wechselwirkung (Chimäre VI). Chimäre VIII unterscheidet sich von Chimäre VII mit intakter Kopplung der Bindungsstellen (SCHWANSTECHE et al., 1998, TOMAN, 2001) in den ersten 13 N-terminalen transmembranären Regionen, die durch den entsprechenden Bereich von SUR1 substituiert wurden. Auch dies führte zu keiner Aufhebung der allosterischen Kopplung, als Indiz dafür, dass auch TMR 12 und 13 keine Bedeutung besitzen. In Chimäre IX ist zusätzlich die NBF2 substituiert und auch dies blieb ohne Einfluss auf die Interaktion (Abb. 35). Die Experimente deuten darauf hin, dass KCOI, KCOII, die TMR12 sowie TMR13 und auch NBF2 keine Bedeutung für die allosterische Kopplung der Bindungsstellen besitzen.



**Abb. 35** Rolle von KCOI, KCOII, TMR12, TMR13 und NBF2 für die allosterische Kopplung. Die Experimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient SUR1, SUR2A, Chimäre VI, VII, VIII und IX exprimierten. Eine intakte negativ-allosterische Wechselwirkung ist mit ✓ gekennzeichnet. Für weitere Details siehe Abb. 32 und 34. Zusammensetzung der Chimären: VI (1-1091 SUR1)-(1059 - 1087 SUR2A)-(1121-1250 SUR1)-(1218-1320 SUR2A) - (1358 - 1582 SUR1), UHDE et al., 2001; VII (1-1499) - (1537 - 1582 SUR1); TOMAN, 2001; VIII (1-1091 SUR1) - (1059 - 1499 SUR2A) - (1537-1582 SUR1); IX (1-1091 SUR1) - (1059-1320 SUR2A) - (1358-1582 SUR1); UHDE et al., 2001.

#### 4.4.2.4 Die SUBR ist kritisch für die Kopplung der sites



**Abb. 36** SUBR ist kritisch für die negativ-allosterische Interaktion. Teil **A** der Abbildung zeigt den Aufbau der Chimären III, VII und X. Eine intakte bzw. aufgehobene negativ-allosterische Wechselwirkung ist mit ✓ bzw. – gekennzeichnet. Für weitere Details und Ergebnisse der Chimären III und VII siehe Abb. 32 bis 35. Zusammensetzung der Chimäre X (1 - 1095 SUR2B) - (1129 - 1242 SUR1) - (1243 - 1499 SUR2B) - (1537-1582 SUR1); TOMAN, 2001. In Teil **B** sind die Verdrängungsbindungs-experimente an Chimäre X dargestellt. Die Experimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient SUR1, SUR2B, Chimäre III, VII und X exprimierten. Aus den resultierenden Bindungskurven an Chimäre X ergaben sich folgende IC<sub>50</sub>-Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus N = 3-5 unabhängigen Einzelerperimenten: [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Glibenclamid (■) 1,6 ± 0,2 nM (-0,99) und [<sup>3</sup>H]P1075 durch Pinacidil (□) 0,22 ± 0,02 μM (-1,01). Bis zu einer Konzentration von 10 μM ließ sich weder [<sup>3</sup>H]P1075 durch Glibenclamid (●) noch [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil (○) deutlich verdrängen.

Ein ganz anderes Bild zeigte sich jedoch bei Substitution der SUBR (Abb. 36). So führte der Transfer der SUBR des SUR1 in SUR2B (Chimäre III; s.a. Abb. 33) ebenso wie der Transfer der SUBR des SUR1 in Chimäre VII (Chimäre X) zu einem jeweils kompletten Verlust der Interaktion. Diese Ergebnisse zeigen, dass neben dem C-Terminus (TOMAN, 2001) auch die SUBR kritische Bedeutung besitzt für die negativ-allosterische Regulation der Bindungsstellen für KCOs und SUs.

#### 4.4.3 Eine Aminosäure der SUBR des SUR beeinflusst die negativ-allosterische Kopplung der hochaffinen Bindungsstellen

Die negativ-allosterische Kopplung der hochaffinen Bindungsstellen für SUs und KCOs ist in Chimäre III, nicht aber in Chimäre II aufgehoben (Abb. 33 und 32). Diese Chimären unterscheiden sich untereinander lediglich im 42 Aminosäuren umfassenden C-Terminus. Chimäre III besitzt den C-Terminus des SUR1 und Chimäre II den des SUR2A. 19 von 42 Aminosäuren sind in den C-Termini different und müssen damit für das abweichende Verhalten bei der negativ-allosterischen Kopplung verantwortlich sein. In früheren Untersuchungen konnten durch schrittweises Ersetzen von Aminosäuren des C-Terminus von SUR1 durch analoge Reste des SUR2A zwei Aminosäuren detektiert werden, die für die negativ-allosterische Kopplung von Bedeutung sind (TOMAN, 2001). Neben der Relevanz des C-Terminus konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die SUBR ebenfalls von kritischem Einfluss für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen von SUs und KCOs ist (4.4.2). Während SUR2B und Chimäre VII eine jeweils intakte Interaktion aufwiesen, war in den Chimären III und X die Kopplung vollständig aufgehoben (Abb. 36).

SUR1	(1129)	C	N	T	I	D	Q	H	I	P	S	T	L	E	C	L	S	R	S	T	L	L	C	V	S	A	L	T	V	I	S	Y	V	T	P	V
SUR2A	(1096)	T	I							P		S	T					L	I	G	M		A													

SUR1	FL	V	A	L	L	P	L	A	V	V	C	Y	F	I	Q	K	Y	F	R	V	A	S	R	D	L	Q	L	D	D	T	T	Q	L	P	L	V	S	H	F	A	E	
SUR2A	I	A	G	A	F																	K	E	S																		

SUR1	T	V	E	G	L	T	T	I	R	A	F	R	Y	E	A	R	F	Q	K	L	E	Y	T	D	S	N	N	I	A	S	L	F	L	T	(1242)									
SUR2A	A																																											

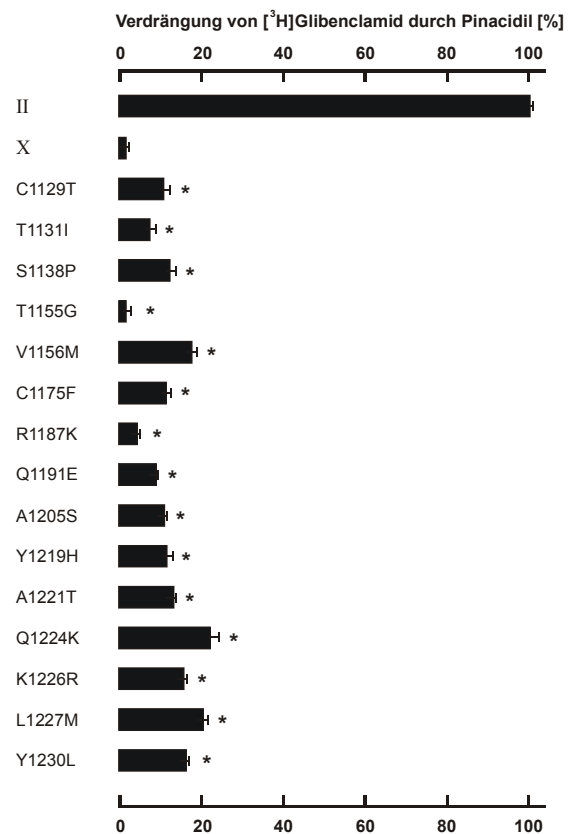
**Abb. 37** In der SUBR sind 31 nicht-konservierte Aminosäuren lokalisiert. Diese Abbildung zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der SUBR des SUR1 (C1129-T1242) und der SUBR des SUR2A (T1096 - S1209). In der jeweils ersten Zeile der Reihen ist ein Sequenzausschnitt des

SUR1 dargestellt, in der jeweils zweiten Zeile sind die zu SUR1 differierenden Aminosäuren (AS) des SUR2A hervorgehoben. 31 der 114 AS differieren zwischen SUR1 und SUR2A. Schwarz unterlegt ist die Pos. S1238 bzw. Y1205, die direkt an der Ausbildung der hochaffinen Bindung von SUs beteiligt ist, jedoch keinen Effekt auf die allosterische Wechselwirkung zeigte (TOMAN, 2001). Grau unterlegt sind die Pos. der AS, die sich in Gestalt, Ladung oder Reaktivität maßgeblich unterscheiden (zum Alignment der Sequenzen siehe: 3.9).

Diese Konstrukte unterscheiden sich in der SUBR. Um Aminosäuren innerhalb der SUBR zu identifizieren, die für die allosterische Wechselwirkung von Bedeutung sind, wurde ein Punktmutationsscreening durchgeführt. Ausgehend von Chimäre X (SUBR des SUR1) wurden systematisch Aminosäuren, die sich in Gestalt, Ladung oder chemischer Reaktivität maßgeblich unterscheiden, durch jene der SUBR von SUR2A ersetzt (Abb. 37). Ziel war es, die negativ-allosterische Wechselwirkung der hochaffinen Bindungsstellen durch singuläre Substitution von Aminosäuren in Chimäre X wieder herzustellen. Nach transienter Expression und Präparation der Membranen wurden die mutanten Chimären in Verdrängungsbindungsexperimenten auf ihre negativ-allosterische Interaktion durch wechselseitige Verdrängung der Liganden untersucht (Abb. 38 und 39).

#### 4.4.3.1 Verdrängung von [ $^3$ H]Glibenclamid durch Pinacidil an Chimäre X mit Punktmutationen in der SUBR

**Abb. 38** Punktmutationen in der SUBR der Chimäre X induzieren keine deutliche Zunahme der Verdrängbarkeit von [ $^3$ H]Glibenclamid durch Pinacidil. Die Experimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimären II und X bzw. die entsprechenden Punktmutationen in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten 0,3 nM [ $^3$ H]Glibenclamid, 100  $\mu$ M MgATP sowie 1 mM freies  $Mg^{2+}$  in Trispuffer (200 mM, pH 7,4) und 100  $\mu$ M Pinacidil. Die Pinacidilkonzentration entsprach somit einem ca. 500-fachen Überschuss, bezogen auf den  $IC_{50}$ -Wert von Pinacidil an Chimäre X. Die Ergebnisse sind dargestellt als Verdrängung von [ $^3$ H]Glibenclamid durch Pinacidil in Prozent bezogen auf die maximale Verdrängung durch 100 nM Glibenclamid. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus N = 4-9 unabhängigen Einzelexperimenten: 100  $\pm$  1 % (II); 1  $\pm$  2 % (X); 11  $\pm$  2 % (C1129T); 7  $\pm$  1 % (T1131I); 12  $\pm$  2 % (S1138P); 1  $\pm$  2 % (T1155G); 17  $\pm$  3 % (V1156M); 11  $\pm$  2 % (C1175F); 4  $\pm$  1 % (R1187K); 8  $\pm$  1 % (Q1191E); 11  $\pm$  1 % (A1205S); 12  $\pm$  1 % (Y1219H); 13  $\pm$  2 % (A1221T); 22  $\pm$  4 % (Q1224K); 15  $\pm$  2 % (K1226R); 20  $\pm$  3 % (L1227M) und 16  $\pm$  1 % (Y1230L); \*  $p > 0,01$  für den Vergleich mit Chimäre X.

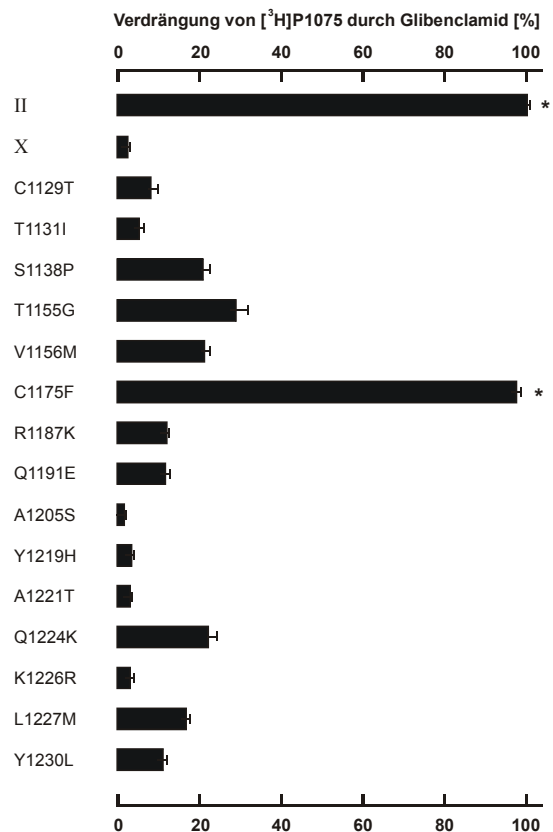


Wie in Abb. 38 dargestellt, wurden 15 isolierte Punktmutationen in Chimäre X eingeführt, bei denen jeweils durch die entsprechende Aminosäure in SUR2A substituiert wurde. Keine der Substitutionen führte zu einer deutlichen Zunahme des Anteils an [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid, der durch Pinacidil verdrängt werden konnte (Abb. 38).

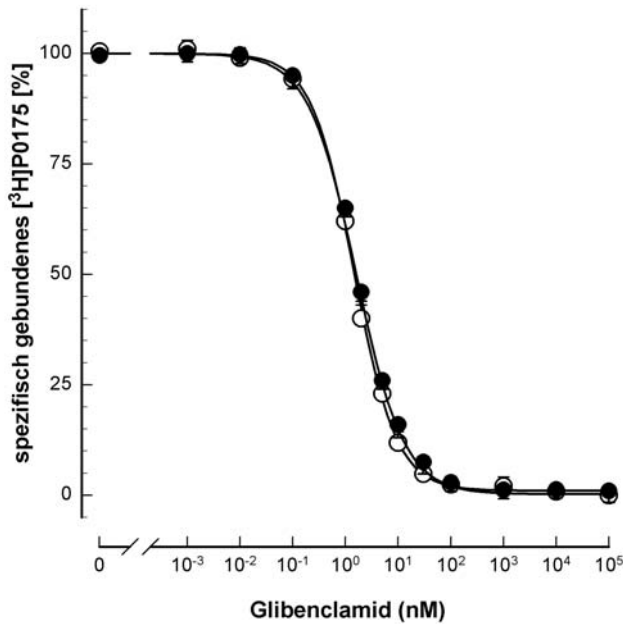
#### 4.4.3.2 Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid an Chimäre X mit Punktmutationen in der SUBR

Bei der Untersuchung der Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid zeigte sich überraschenderweise ein abweichendes Bild: 14 der 15 untersuchten Substitutionen induzierten keine bzw. keine deutliche Zunahme der Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid. Die prozentuale Verdrängung variierte analog zur reziproken Untersuchung (Abb. 38) zwischen ca. 1 % und 25 %. Nur ein einziger Austausch, die Substitution des Cysteins in Position 1175 gegen Phenylalanin, induzierte eine fast vollständige Rekonstituierung der negativ-allosterischen Kopplung der Bindungsstellen. Glibenclamid konnte [ $^3\text{H}$ ]P1075 zu über 96 % verdrängen (Abb. 39).

**Abb. 39** Eine Punktmutation in der SUBR der Chimäre X induziert eine deutliche Zunahme der Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid. Die Experimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimären bzw. die entsprechenden Punktmutationen in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten 3 nM [ $^3\text{H}$ ]P1075, 100  $\mu\text{M}$  MgATP sowie 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  in Tris-puffer (200 mM, pH 7,4) und 100 nM Glibenclamid. Diese Konzentration entsprach einem ca. 60-fachen Überschuss, bezogen auf den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Glibenclamid an Chimäre X. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $N = 4-9$  unabhängigen Experimenten:  $100 \pm 2$  % (II);  $2 \pm 2$  % (X);  $7 \pm 1$  % (C1129T);  $5 \pm 1$  % (T1131I);  $21 \pm 3$  % (S1138P);  $27 \pm 4$  % (T1155G);  $21 \pm 3$  % (V1156M);  $96 \pm 2$  % (C1175F);  $12 \pm 2$  % (R1187K);  $11 \pm 2$  % (Q1191E);  $1 \pm 1$  % (A1205S);  $3 \pm 1$  % (Y1219H);  $2 \pm 1$  % (A1221T);  $22 \pm 3$  % (Q1224K);  $2 \pm 2$  % (K1226R);  $16 \pm 1$  % (L1227M) und  $11 \pm 1$  % (Y1230L); \*  $p < 0,01$  für den Vergleich mit Chimäre X.



Die partielle Wiederherstellung der allosterischen Interaktion durch die singuläre Substitution des Cysteins wurde in Verdrängungsbindungsexperimenten detaillierter untersucht. Dabei zeigte sich, dass die für die Punktmutation C1175F in Chimäre X resultierende Verdrängungskurve von der für Chimäre II nicht zu unterscheiden war. Der Kurvenverlauf, die halbmaximal-inhibitorische Konzentration von Glibenclamid zur Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 und der Steigungskoeffizient war nahezu identisch zu den Parametern der Chimäre II (Abb. 40).



**Abb. 40** Einfluss von Glibenclamid auf die Bindung von [ $^3$ H]P1075 an C1175F in Chimäre X im Vergleich zu Chimäre II. Die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch steigende Konzentrationen an Glibenclamid wurde an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre II und C1175F in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten 3 nM [ $^3$ H]P1075, 100  $\mu$ M MgATP, 1 mM freies  $Mg^{2+}$  und steigende Konzentrationen an Glibenclamid. Die Ergebnisse sind angegeben in Prozent der spezifischen Bindung von [ $^3$ H]P1075. Die unspezifische Bindung wurde in Reaktionsansätzen ermittelt, die zusätzlich 100  $\mu$ M Pinacidil ent-

hielten. Aus den Mittelwerten  $\pm$  SEM (falls größer als das Symbol) und den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 3-5$  unabhängigen Einzelerperimenten: (●) Chimäre II  $1,6 \pm 0,2$  nM (-0,96); (○) C1175F in Chimäre X  $1,5 \pm 0,3$  nM (-1,04).

#### 4.4.3.3 Die Affinitäten für SUs und KCOs werden durch die Substitution C1175F in Chimäre X nicht beeinflusst

Um zu klären, ob die Rekonstitution der negativ-allosterischen Interaktion durch Substitution des Cysteins in Pos. 1175 zu Phenylalanin in Chimäre X auf einer Modulierung der Affinitäten von SUs und / oder KCOs basiert, wurden in Bindungsstudien die Affinitäten der Liganden vergleichend zu Chimäre X untersucht. Für das humane P-Glycoprotein (Pgp), das wie der SUR ein Mitglied der Familie der ABC-Proteine darstellt (1.8.2), konnte durch LOO und CLARKE aufgezeigt werden, dass eine zu C1175 homologe Position (Abb. 41) des Pgp I868 an der Ausbildung der Substrat-bindenden Domäne beteiligt ist (LOO und CLARKE, 2000).

**Abb. 41** Die Aminosäure Isoleucin in Pos. 868 des P-Glycoproteins ist homolog

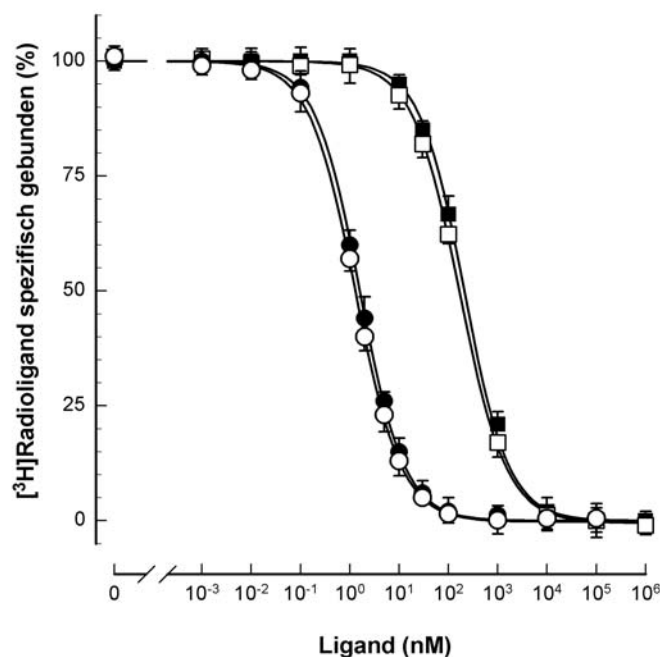
SUR1	(1165)	LVALPLAVV-CYFIQKYF-RVASRDLQQL	(1192)
Pgp	(857)	LTLLLLAIVPIIAIAGVVMKMLS--GQAL	(884)

zu Cystein in Pos. 1175 des SUR1. Diese Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Aminosäuresequenzen des SUR1 und des humanen P-Glycoproteins 1 (Pgp, Multidrug Resistance Protein 1, Kenn- Nr.: P08183). Die homologen Positionen: I868 des Pgp und C1175 des SUR1 sind grau unterlegt, die Positionierung der Sequenzen im Gesamtprotein ist in Klammern angegeben. Das Alignment der Sequenzen wurde mit ClustalX durchgeführt (3.9).

Die in Verdrängungsexperimenten an C1175F in Chimäre X ermittelten  $IC_{50}$ -Werte und Steigungskoeffizienten für Glibenclamid und Pinacidil unterschieden sich nicht signifikant von den Werten für Chimäre X. Die Affinitäten für beide Liganden blieben durch die Substitution (1,3 nM für Glibenclamid bzw. 0,20  $\mu$ M für Pinacidil, Abb. 42) also unverändert. Diese Untersuchungen zeigen, dass durch eine singuläre Punktmutation innerhalb der SUBR die negativ-allosterische Interaktion zwischen den Bindungsstellen für SUs und KCOs moduliert werden kann. Um diese Aminosäure mit offenbar kritischer Bedeutung näher zu analysieren, wurde eine Serie von Substitutionen dieses Restes durchgeführt.

**Abb. 42** Die Substitution C1175F in Chimäre X führt zu keiner Änderung der Affinitäten für SUs und KCOs.

Die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch steigende Konzentrationen an Glibenclamid bzw. [ $^3$ H]Glibenclamid durch Pinacidil wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre X und C1175F in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten entweder 3 nM [ $^3$ H]P1075 oder 0,3 nM [ $^3$ H]Glibenclamid, 100  $\mu$ M MgATP, 1 mM freies  $Mg^{2+}$  und steigende Konzentrationen an Glibenclamid oder Pinacidil. Die Ergebnisse sind angegeben in Prozent des spezifisch gebundenen [ $^3$ H]Radioliganden. Die unspezifische Bindung wurde durch 100  $\mu$ M Pinacidil bzw. 100 nM Glibenclamid bestimmt. Aus den Mittelwerten  $\pm$  SEM und den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 3-5$  unabhängigen Einzelexperimenten für die Verdrängung von [ $^3$ H]Glibenclamid durch nicht markiertes Glibenclamid: (●) Chimäre X  $1,6 \pm 0,2$  nM (-0,99); (○) C1175F in Chimäre X  $1,3 \pm 0,1$  nM (-1,04) bzw. für die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch Pinacidil: (■) Chimäre X  $0,22 \pm 0,02$   $\mu$ M (-1,01) und (□) C1175F in Chimäre X  $0,20 \pm 0,03$   $\mu$ M (-1,01).





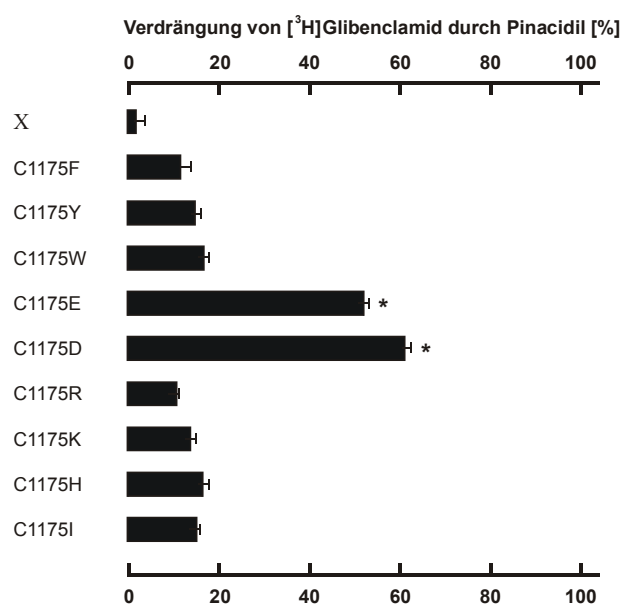
#### 4.4.3.4 Unterschiedliche Substituenten in Position 1175 modulieren die allosterische Interaktion der sites

##### A) Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch Pinacidil

Dabei ergab sich, dass eine Reihe von Substituenten die Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch Pinacidil ähnlich wie C1175F nur geringfügig steigerten. Die prozentuale Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid variierte für die Austausche gegen eine weitere aromatische Aminosäure Tyrosin, für basische Reste wie Arginin und Lysin, für die aliphatische Aminosäure Isoleucin, als auch für Heterozyklen wie Tryptophan und Histidin zwischen 11 % und 17 %. Die negativ geladenen Substituenten hingegen induzierten mit 53 % für Glutamat bzw. 61 % für Aspartat eine deutliche Zunahme des Anteils von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid, der durch Pinacidil verdrängt werden konnte (Abb. 43).

**Abb. 43** *Negativ geladene Substituenten in Pos. 1175 der Chimäre X induzieren eine Zunahme der Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch Pinacidil.* Die Verdrängungsexperimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre X und Punktmutationen in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten 0,3 nM [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid, 100  $\mu\text{M}$  MgATP und 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  in Trispuffer (200 mM, pH 7,4) und 100  $\mu\text{M}$  Pinacidil. Die Pinacidilkonzentration entsprach somit einem ca. 500-fachen Überschuss, bezogen auf den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Pinacidil an Chimäre X. Die

Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]Glibenclamid durch Pinacidil bezogen auf die maximale Verdrängung durch 100 nM Glibenclamid. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus N = 6-12 unabhängigen Einzelexperimenten:  $1 \pm 2$  % (X);  $11 \pm 2$  % (C1175F);  $15 \pm 2$  % (C1175Y);  $17 \pm 1$  % (C1175W);  $53 \pm 4$  % (C1175E);  $61 \pm 3$  % (C1175D);  $11 \pm 1$  % (C1175R);  $14 \pm 2$  % (C1175K);  $16 \pm 3$  % (C1175H);  $15 \pm 1$  % (C1175I); \*  $p < 0,01$  für den Vergleich mit Chimäre X.

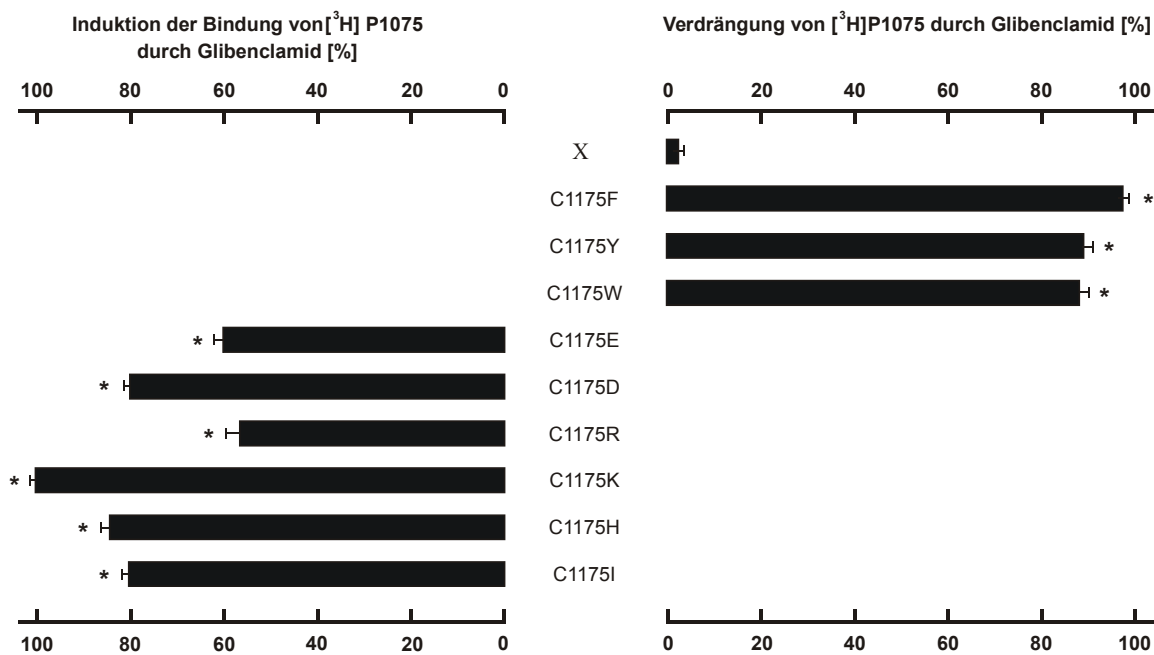


##### B) Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid

In Analogie zum Austausch des Cysteins gegen die aromatische Aminosäure Phenylalanin führten Mutationen zu zwei weiteren Aromaten bzw. Heterozyklen, Tyrosin und Tryptophan,



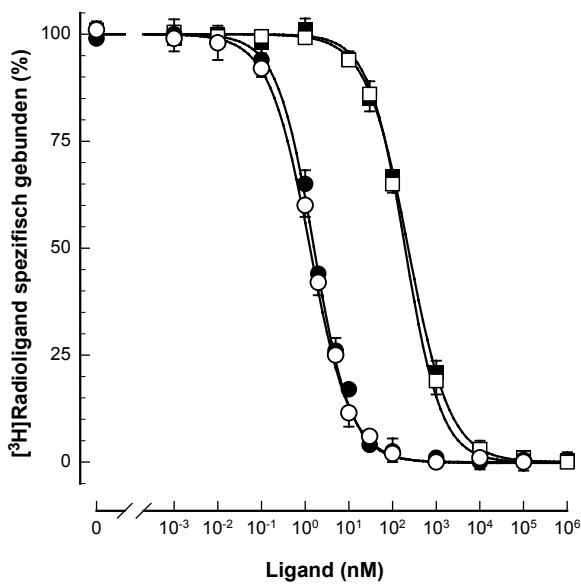
erwartungsgemäß zu ähnlichen Ergebnissen: Die Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid erreichte jeweils Werte von annähernd 90 %. Überraschenderweise führte die Zugabe von Glibenclamid bei allen weiteren Substitutionen: gegen Glutamat, Aspartat, Arginin, Lysin, Histidin oder Isoleucin jedoch nicht zu einer Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075, sondern zu einer zusätzlichen Induktion der Bindung weit über das Anfangsniveau hinaus. Am stärksten ausgeprägt war der Effekt bei der Substitution C1175K in Chimäre X mit einer über 100 %igen Steigerung der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 (Abb. 44).



**Abb. 44** Einfluss von Glibenclamid auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 an Chimäre X mit einer Serie von Substitutionen des Restes C1175. Die Bindungsexperimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient die Chimäre X und eine Serie von Punktmutationen des Cystein-Restes in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten 3 nM [ $^3\text{H}$ ]P1075, 100  $\mu\text{M}$  MgATP und 1 mM freies  $\text{Mg}^{2+}$  in Trispuffer (200 mM, pH 7,4) und 100 nM Glibenclamid. Die Glibenclamidkonzentration entsprach somit einem ca. 60-fachen Überschuss, bezogen auf den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von Glibenclamid an Chimäre X. Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Verdrängung bzw. Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid bezogen auf die maximale Verdrängung durch 100  $\mu\text{M}$  Pina-cidil. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus N = 6-12 unabhängigen Einzelerperimenten: Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid:  $2 \pm 2$  % (X);  $96 \pm 2$  % (C1175F);  $88 \pm 4$  % (C1175Y);  $87 \pm 5$  % (C1175W); Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Glibenclamid:  $61 \pm 2$  % (C1175E);  $81 \pm 3$  % (C1175D);  $57 \pm 2$  % (C1175R);  $101 \pm 3$  % (C1175K);  $85 \pm 3$  % (C1175H);  $80 \pm 2$  % (C1175I); \* p < 0,01 für den Vergleich mit Chimäre X.

#### 4.4.3.5 Die durch Glibenclamid induzierte Zunahme der Bindung von [ $^3$ H]P1075 ist nicht auf einen Anstieg der Affinität zurückzuführen

Die Substitution des Cysteins gegen Lysin hatte den deutlichsten Einfluss auf die Glibenclamid-vermittelte Induktion der Bindung von [ $^3$ H]P1075. Um der Frage nachzugehen, ob die Zunahme der Bindung von [ $^3$ H]P1075 durch Zusatz von Glibenclamid auf einen Anstieg der Affinität für [ $^3$ H]P1075 zurückzuführen sein könnte, wurde die Affinität für Pinacidil in An- und Abwesenheit von 100 nM Glibenclamid an der Mutante C1175K in Chimäre X analysiert (Abb. 45). Zusätzlich wurde der Einfluss von 30  $\mu$ M Pinacidil auf die Affinität für Glibenclamid untersucht. Dabei ergab sich, dass die in kompetitiven Verdrängungsbindungsexperimenten bestimmten halbmaximal-inhibitorischen Konzentrationen mit  $0,20 \pm 0,04 \mu$ M bzw.  $0,21 \pm 0,02 \mu$ M für Pinacidil und  $1,3 \pm 0,2$  nM bzw.  $1,6 \pm 0,3$  nM für Glibenclamid (jeweils in An- bzw. Abwesenheit von Glibenclamid oder Pinacidil bestimmt) untereinander und im Vergleich zu Chimäre X nahezu identisch waren. Auch die Steigungskoeffizienten lagen jeweils nahe -1. Die Affinitäten für beide Liganden an den hochaffinen sites bleiben also durch diese Substitution auch in Anwesenheit des jeweiligen allosterischen Liganden unverändert.



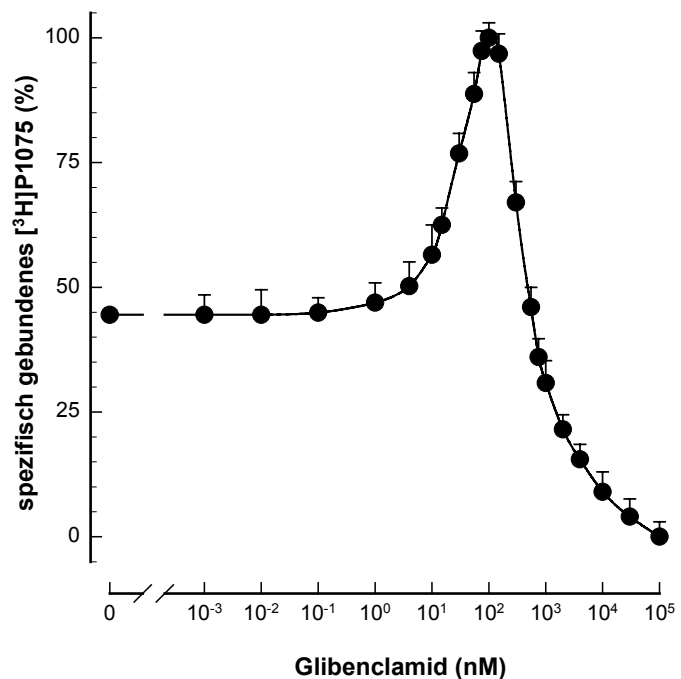
**Abb. 45** Einfluss von Glibenclamid auf die Affinität von Pinacidil und von Pinacidil auf die Affinität von Glibenclamid für Chimäre X-C1175K. Die kompetitiven Verdrängungen beider Liganden wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient C1175K in Chimäre X exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Inkubationsansätze enthielten entweder 0,3 nM [ $^3$ H]Glibenclamid oder 3 nM [ $^3$ H]P1075, 100  $\mu$ M MgATP, 1 mM freies  $Mg^{2+}$  und steigende Konzentrationen an Glibenclamid oder Pinacidil. Zur Bestimmung der Affinitäten in Anwesenheit allosterischer Liganden wurde für die Verdrängung von [ $^3$ H]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid

zusätzlich 30  $\mu$ M Pinacidil und für die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch Pinacidil 100 nM Glibenclamid zugesetzt. Die Ergebnisse sind angegeben in Prozent des spezifisch gebundenen [ $^3$ H]Radioliganden. Aus den Mittelwerten  $\pm$  SEM und den resultierenden Bindungskurven ergaben sich folgende  $IC_{50}$ -Werte und Hill-Koeffizienten (in Klammern) aus  $N = 4-6$  unabhängigen Einzelerperimenten für die Verdrängung von [ $^3$ H]Glibenclamid durch nicht-markiertes Glibenclamid: (●)  $1,6 \pm 0,1$  nM (-1,03) in Abwesenheit und (○)  $1,3 \pm 0,2$  nM (-0,96) in Anwesenheit von Pinacidil bzw. für die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch Pinacidil: (■)  $0,21 \pm 0,04 \mu$ M (-0,97) in Abwesenheit und (□)  $0,20 \pm 0,02 \mu$ M (-1,04) in Anwesenheit von Glibenclamid.

#### 4.4.3.6 Einfluss der Glibenclamid-Konzentration auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 an Chimäre X-C1175K

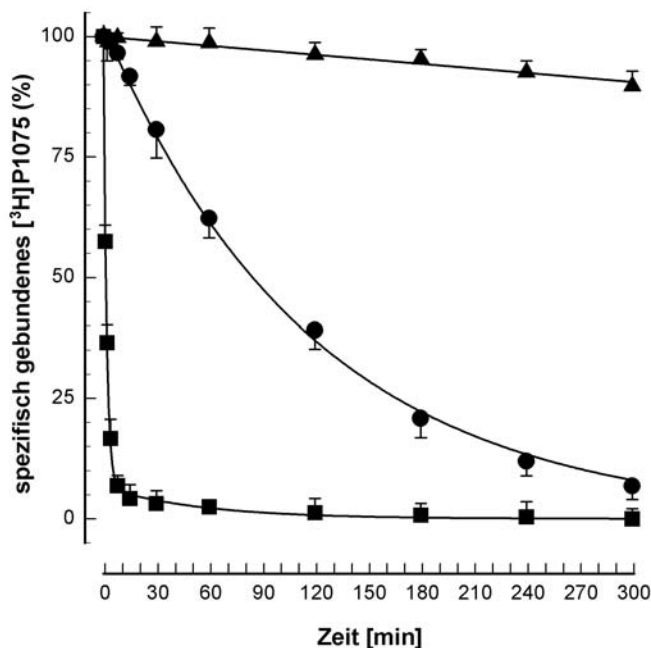
Um den Effekt der Glibenclamid-vermittelten Induktion der [ $^3\text{H}$ ]P1075-Bindung an Chimäre X-C1175K (Abb. 44) näher zu analysieren, wurde der Einfluss steigender Konzentrationen von Glibenclamid auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 untersucht. Glibenclamid induzierte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Bindung des [ $^3\text{H}$ ]-markierten Radioliganden. Höhere Konzentrationen an Glibenclamid führten jedoch konzentrationsabhängig zu einer fast vollständigen Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075. Das Maximum entsprach etwa einer Verdopplung der Bindung und wurde bei 100 nM Glibenclamid beobachtet (Abb. 46).

**Abb. 46** Einfluss der Glibenclamid-Konzentration auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 an C1175K in Chimäre X. Die Bindungsexperimente wurden an Membranen aus COS1-Zellen durchgeführt, die transient Chimäre X-C1175K exprimierten (s.a. 3.8.5). Die Ergebnisse sind dargestellt in Prozent der spezifischen Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 (3 nM). Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Pinacidil bestimmt. Aus den Mittelwerten  $\pm$  SEM ergab sich aus N = 5 unabhängigen Einzelerperimenten ein zweiphasiger Verlauf für die resultierende Bindungskurve mit Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch den allosterischen Liganden bis zu einer Konzentration von 100 nM und einem  $\text{EC}_{50}$ -Wert von ca. 20 nM bzw. Verdrängung der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 im Konzentrationsbereich über 100 nM Glibenclamid. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für die Verdrängung des Radioliganden durch Glibenclamid lag bei ca. 0,6  $\mu\text{M}$ .



#### 4.4.3.7 Einfluss von Glibenclamid auf die Kinetik der Dissoziation des Komplexes zwischen Chimäre X-C1175K und [ $^3\text{H}$ ]P1075

Zur weiteren Analyse der allosterischen Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs an der Chimäre X-C1175K wurden Dissoziationsstudien durchgeführt. Diese Studien erlauben Aussagen über Art und Weise der Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch hohe Konzentrationen an Glibenclamid. Dazu wurde die Dissoziation des Rezeptor-Radioligand-Komplexes von Chimäre X-C1175K und [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch Zugabe eines Überschusses an nicht-markiertem Pinacidil und durch Zugabe einer Kombination von Pinacidil und nicht-markiertem Glibenclamid induziert. Es ergaben sich Kurven, die nach Auswertung (3.11.4 A und B) für monophasisch (Pinacidil) bzw. biphasisch (Kombination von Pinacidil und Glibenclamid) ablaufende Dissoziationen sprachen (Abb. 47).



**Abb. 47** Einfluss von Glibenclamid auf die Dissoziation des Komplexes zwischen [ $^3\text{H}$ ]P1075 und C1175K in Chimäre X. Membranen aus COS1-Zellen mit transient exprimierter Chimäre X-C1175K wurden 60 min in Gegenwart von [ $^3\text{H}$ ]P1075 in einer Endkonzentration von 3 nM, 400  $\mu\text{M}$  MgATP und 1 mM freiem  $\text{Mg}^{2+}$  in Trispuffer (200 mM, pH 7,4) vorinkubiert. Zum Zeitpunkt  $t = 0$  Minuten wurden die Dissoziationen durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Pinacidil (●) bzw. durch kombinierte Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Pinacidil und 10  $\mu\text{M}$  Glibenclamid (■) zu einem Aliquot des Inkubationsmediums

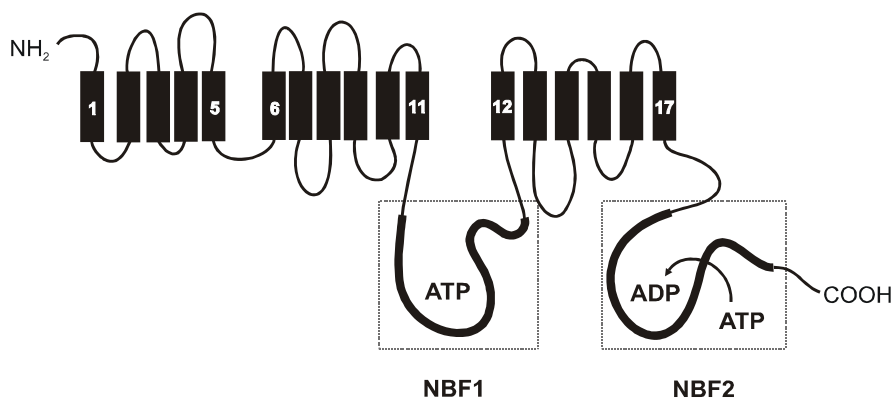
gestartet. Der Rest des Inkubationsansatzes diente als Kontrolle (▲). Angegeben sind jeweils die Endkonzentrationen der Substanzen im Ansatz. Zu vordefinierten Zeiten (s.o.) wurden Aliquote der Ansätze entnommen und die Inkubationen durch Filtration beendet (s.a. 3.8.5). Die Bindungen wurden als relative Prozentsätze der spezifischen Bindung zum Zeitpunkt  $t = 0$  bestimmt und als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $N = 3$  unabhängigen Einzelerperimenten angegeben. Die Analyse der jeweiligen Zeitkurven ergab folgende Konstanten (3.11.4 A und B):  $k = 8,46 \cdot 10^{-3} \pm 0,51 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  bei  $B = 102 \%$  für die Dissoziation induziert durch Pinacidil (●) bzw. bei kombinierter Zugabe von Pinacidil und Glibenclamid:  $k_1 = 0,57 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  und  $k_2 = 0,018 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$  bei  $B_1 = 93,4 \%$  und  $B_2 = 6,6 \%$  (■).

Hier zeigte sich, dass Glibenclamid einen starken Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes zwischen Chimäre X-C1175K und [<sup>3</sup>H]P1075 besitzt. Für die Dissoziation induziert durch 100 µM Pinacidil, die am besten durch eine monophasische Kinetik beschrieben werden konnte, ergab sich eine Geschwindigkeitskonstante von  $8,46 \cdot 10^{-3} \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (B = 102 %). Die gleichzeitige Applikation einer Kombination aus 100 µM Pinacidil und 10 µM Glibenclamid jedoch führte zu einer biphasisch ablaufenden Dissoziation, deren Kinetik sich mit  $k_1 = 0,57 \pm 0,04 \text{ min}^{-1}$  (B<sub>1</sub> = 93,4 %) und  $k_2 = 0,018 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$  (B<sub>2</sub> = 6,6 %) drastisch von der durch Pinacidil alleine unterschied. Die gleichzeitige Zugabe des allosterischen Liganden Glibenclamid induziert also eine starke Beschleunigung der Dissoziation von [<sup>3</sup>H]P1075 von Chimäre X-C1175K. Dieser Befund zeigt, dass die Glibenclamid-induzierte Hemmung der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 auf eine allosterische Interaktion zurückzuführen ist.

## 5 Diskussion

### 5.1 Rolle der NBFs ins SURs

Zahlreiche Substitutionen, Insertionen und Deletionen in SUR1 sind ursächlich für die hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kleinkindes (HI). Diese Mutationen finden sich im gesamten SUR - eine Häufung der HI-induzierenden Mutationen in NBF2 ist jedoch offensichtlich (s. Abb. 11; FOURNET und JUNIEN, 2003). Da bislang weit weniger krankheits-induzierende Mutationen in NBF1 gefunden wurden, könnte dies ein Indiz dafür sein, dass sich Mutationen in NBF1 wesentlich stärker auf die Funktion des  $K_{ATP}$ -Kanals auswirken als solche, die in NBF2 lokalisiert sind. Die unterschiedliche Anzahl der Mutationen in den Nukleotid-bindenden Domänen legen weiterhin die Vermutung nahe, dass NBF1 und NBF2 unterschiedliche Funktionen besitzen könnten. Postuliert werden derzeit zwei Modelle für die Funktionen der NBFs in SURs. Ein asymmetrisches Modell (Abb. 49) geht von einer Interaktion von Nukleosidtriphosphaten (NTP; wie z.B. ATP) in NBF1 und Nukleosiddiphosphaten (NDP; wie z.B. ADP und GDP) nach erfolgter Hydrolyse von NTP in NBF2 aus (UEDA et al., 1997; 1999; MATSUO et al., 1999). Hier wird angenommen, dass eine Inhibierung des Abdissoziierens von NDP in NBF2 - z.B. durch einen Anstieg der cytosolischen Konzentration von ADP - eine Öffnung des  $K_{ATP}$ -Kanals durch Stabilisierung der posthydrolytischen Konformation induziert. Sinkende NDP-Konzentrationen, wie z.B. durch enzymatisches Abfangen von MgADP würden demnach in einem Schließen des Kanals resultieren (BIENENGRAEBER et al., 2000; ZINGMAN et al., 2001; 2002).



**Abb. 49** Asymmetrisches Modell für die Interaktion von ATP und ADP in den NBFs des SUR (für Details: siehe Text).

Dem gegenüber steht ein Modell mit symmetrischer Funktion der NBFs, bei dem angenommen wird, dass alternierende katalytische Zyklen aus ATP-Bindung und -Hydrolyse in NBF1 und NBF2 den SUR aus seinem für KCOs und NDPs insensitiven Zustand in die sensitive Konformation schalten. KCOs und NDPs interagieren nur mit dieser sensitiven „on“-Konformation (SCHWANSTECHEER et al., 1998; SIEVERDING, 1998b; DÖRSCHNER et al., 1999).

Um das asymmetrische und symmetrische Modell für die Funktionen der NBFs zu prüfen, wurden die beiden NBFs des SUR strukturell sowie funktionell miteinander verglichen. Dazu wurden zunächst Homologie-Modelle der beiden NBFs auf Basis struktureller Daten eines eng verwandten Nukleotid-bindenden Proteins des TAP1 abgeleitet (s. 3.9 und 3.10 bzw. 4.1.3). Darüber hinaus wurden systematisch Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren (s. 4.2, 5.4.1 und 5.4.2) als auch HI-analoge Mutationen (s. 4.3 und 5.4.3) jeweils in NBF1 und NBF2 des SUR2A homolog eingebracht und deren Einfluss auf die MgATP-abhängige Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 vergleichend untersucht.

## **5.2 Die Tertiärstrukturen der NBFs des SUR2A und des TAP1 sind weitgehend identisch**

Ein gängiges Verfahren zur Aufklärung der Architektur und Funktionsweise von Proteinen ist die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse. Für den SUR ist dies bislang aufgrund der Größe und hohen Lipophilie nicht gelungen. Zahlreiche Tertiärstrukturen Nukleotid-bindender Untereinheiten diverser ABC-Transporter jedoch konnten in den letzten Jahren aufgeklärt werden (HUNG et al., 1998; DIEDERICHs et al., 2000; GAUDET und WILEY, 2001; KARPOWICH et al., 2001; LAMERS et al., 2000; YUAN et al., 2001). Diese Daten bilden den Ansatzpunkt zur Ableitung homologer 3D-Strukturen von NBFs eng verwandter ABC-Proteine. Berechnungsgrundlage für die Modelle der NBF1 und NBF2 des SUR2A war die hochauflösende Kristallstruktur der NBF des TAP1 - des Nukleotid-bindenden Proteins des humanen Antigen-Peptidtransporters (GAUDET und WILEY, 2001). Der Vergleich der Aminosäuren der NBF des TAP1 und NBF1 des SUR2A (s. Abb. 14) ergab eine 30 %ige Identität der Sequenzen, der Vergleich mit NBF2 einen Wert von 29 % (PDB FASTA-Search, PEARSON und LIPMAN, 1988; s. 3.9), als Indiz dafür, dass sich die Raumstrukturen der NBFs des TAP1 und des SUR2A nicht wesentlich unterscheiden. Tatsächlich führen Proteine mit signifikanter Sequenzhomologie (> 25%) fast immer zu sehr ähnlichen dreidimensionalen Strukturen (PEARSON und LIPMAN, 1988; ALTSCHUL et al., 1990a). In den errechneten Analogmodellen für die NBF1 und

NBF2 des SUR verbindet, in Analogie für die NBFs weiterer ABC-Transporter wie z.B. für HisP (HUNG et al., 1998) oder TAP1 (GAUDET und WILEY, 2001) gezeigt, ein Bereich aus 6  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen die beiden Hauptsegmente der Nukleotid-bindenden Untereinheit: Arm I und Arm II. Die ATP-bindende Tasche befindet sich am Ende des cytosolisch ausgerichteten ersten Arms (s.a. Abb. 15). Zeitgleich zu diesen Untersuchungen konnten für die NBFs des SUR1 auf Basis der Daten des HisP (BEYER et al., 2001) bzw. des MJ0796 (CAMPBELL et al., 2003) zu den NBFs des SUR2A nahezu identische Analogmodelle abgeleitet werden.

### **5.3 Strukturelle Symmetrie der NBFs in SURs**

Der Sequenzvergleich der beiden NBFs des SUR2A untereinander (s. Abb. 14) zeigte eine Homologie der Positionen von über 26 % bei Betrachtung ausschließlich identischer Aminosäuren bzw. annähernd 50 % unter Berücksichtigung streng homologer Austausche wie Substitutionen aromatischer Aminosäuren z.B. Tyrosin gegen Phenylalanin oder saurer Reste z.B. Aspartat gegen Glutamat (HIGGINS und SHARP, 1988). Bei Überlagerung der Tertiärstrukturen von NBF1 und NBF2 zeigte sich neben diskreten Unterschieden in Form von insgesamt 8 Insertionen von Aminosäuren in NBF1 im Vergleich zu NBF2 mit einer über 95 %igen Übereinstimmung eine weitgehend identische Raumstruktur (s. Abb. 16).

Diese Ergebnisse sind zum einen Indiz dafür, dass die NBFs von SURs offensichtlich jeweils eine Tertiärstruktur besitzen, die mit der von TAP1 weitgehend übereinstimmt, zum anderen sind diese Befunde klares Zeichen für eine weitreichende strukturelle Symmetrie der NBF1 und NBF2 des SUR2A.

### **5.4 Funktionelle Symmetrie der NBFs in SURs**

#### **5.4.1 Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren**

Um die Analogmodelle der NBFs anhand funktioneller Charakterisierungen weiter zu prüfen, wurden zunächst hochkonservierte Aminosäuren in NBF1 und NBF2 homolog substituiert und der Einfluss der Mutationen auf die Bindung von [ $^3$ H]P1075 vergleichend untersucht (s. 4.2). In früheren Untersuchungen war bereits gezeigt worden, dass KCOs wie Pinacidil, P1075 oder Diazoxid ihre Wirkung auf sekretorische Zellen, Neuronen und Muskelzellen entfalten, indem sie den  $K_{ATP}$ -Kanal öffnen (EDWARDS und WESTON, 1995; QUAST und COOK, 1989; LAWSON,



1996) und dass die hochaffine Bindung von KCOs auf SURs ebenso wie die Bindung von NDPs (ADP und GDP) eine ATP-Bindung und vermutlich auch ATP-Hydrolyse in beiden NBFs erfordert (SCHWANSTECHEER et al., 1998; DÖRSCHNER, 2000). Bei der Untersuchung von hochkonservierten Aminosäuren zeigte sich, dass die Substitutionen im Bereich der Linker Region (S1446F und G1448I), das für die siebte  $\alpha$ -Helix strukturell wichtige Aspartat in Pos. 1476 gegen Arginin und der Austausch des  $Mg^{2+}$ -stabilisierenden Aspartats in Pos. 1469 gegen Glutamat zu einer jeweils vollständigen Aufhebung der ATP-induzierten Bindung von [ $^3H$ ]P1075 führte. Bei Substitution der Aminosäuren, die an der Koordination des  $\gamma$ -Phosphats beteiligt sind (Q1390, D1470 und H1504) ergab sich jeweils eine deutliche Rechtsverschiebung für die Induktion der Bindung von [ $^3H$ ]P1075 durch MgATP (s. Abb. 18).

Die Analyse der analogen Punktmutationen in NBF1 ergab ein ganz ähnliches Bild für die funktionellen Konsequenzen, wobei die Effekte jeweils deutlich stärker ausgeprägt waren als in der NBF2. So führte die Substitution des Glutaminrestes in Pos. 753 gegen Glutamat zu einer deutlich stärkeren Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP als die entsprechende Punktmutation in NBF2. Neben den Austauschen, D832E, D839R, S809F und G811I, die auch in analogen Positionen in NBF2 keine Bindung zeigten, wurde auch für die Substitution des Aspartats in Pos. 833 gegen Lysin und Histidins in Pos. 876 gegen Glutamat eine komplette Aufhebung der Bindung beobachtet, während die entsprechenden Mutationen in NBF2 zwar zu einer Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP, nicht aber zu einem kompletten Verlust der Bindung führten (s. Abb. 20).

Nahezu identische Ergebnisse erzeugten homologe Substitutionen in den NBFs des SUR1. So führten zahlreiche Austausche hochkonservierter Aminosäuren jeweils entweder zu einem partiellen bzw. kompletten Verlust der Bindung von Diazoxid (z.B. Q1427L, H889D korrespondierend zu den Pos. Q1390, H867 in den NBFs des SUR2A; TAWAKKOL, 2001) oder zu einer Aufhebung der Aktivierbarkeit rekombinanter SUR1/ $K_{IR}6.2$ -Kanäle durch NDPs wie MgADP (z.B. D853K, D1505K, S830F, S1482F äquivalent zu den Pos. D832, D1469, S809, S1446 in den NBFs des SUR2A; GRIBBLE et al., 1997; SHYNG et al., 1997; MATSUO et al., 2002). Auch in weiteren ABC-Proteinen wie z.B. in HisP oder TAP1 führten Mutationen homologer Reste zu reduzierter oder vollständig aufgehobener ATPase-Aktivität und dadurch beeinträchtigtem Substanztransport (SHYAMALA et al., 1991; HUNG et al., 1998; GAUDET und WILEY, 2001; SAVEANU et al., 2001).

### 5.4.2 Modulation der Stabilisierung des Nukleotid-Adeninrings

Um die Indizien für eine funktionelle Symmetrie der NBFs in SURs weiter zu prüfen, wurde in einer Serie von Mutationen eines Restes, der eine kritische Bedeutung für die Stabilisierung des ATP-Moleküls besitzt (CROOP, 1998; HUNG et al., 1998; BERGER und WELSH, 2000), die funktionelle Relevanz verschiedener Substituenten durch den Einfluss auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 in NBF1 und NBF2 vergleichend untersucht (s. 4.2.5 bis 4.2.7). Diese aromatische Aminosäure, die jeweils ca. 25 Reste vor dem Walker A Motiv lokalisiert ist, ist in der Gruppe der ABC-Transporter hochgradig konserviert (s. Abb. 21).

Die Substitutionen des Tyrosins in Position 1317 (NBF2; s. Abb. 23) bzw. Phenylalanins in Position 675 (NBF1; s. Abb. 24) führten erneut jeweils entweder zu einer moderaten bzw. deutlichen Rechtsverschiebung des  $\text{EC}_{50}$  für MgATP oder zu einem kompletten Verlust der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075. Der Austausch der aromatischen Aminosäure zu Arginin erlaubt durch eine Rotamer-Konformation in zum Aromaten vergleichbarem Abstand und Ausrichtung der Seitenkette eine ähnlich gute Stabilisierung des Adeninrings wie Tyrosin selbst. Die hydroxylierte Aminosäure Serin kann aufgrund ihrer Größe nur noch geringfügig interagieren, wohingegen beide Rotamere des Leucins zu dicht an der Adeninbase liegen und so vermutlich die Orientierung des ATP beeinflussen. Die Einführung von Asparaginsäure in dieser Position führt wahrscheinlich zu einer über die negative Ladung der Aminosäure bestimmten Störung der ATP-Ausrichtung. Die Aminosäure Prolin, die wegen ihres großen sterischen Platzbedarfes auch als „Helix-Brecher“ bekannt ist, bewirkt in Peptidketten oftmals einen scharfen haarnadelförmigen Knick, durch den die Ausbildung von Sekundärstrukturen verändert wird - ähnlich wie es auch bei Deletion des Aromaten zu erwarten wäre (s. Abb. 22).

Auch hierbei waren die Effekte der Substitutionen in NBF1 deutlich stärker ausgeprägt als in den homologen Positionen in NBF2 (s. 4.2.6 und 4.2.7). Dies könnte darauf beruhen, dass die durch Substitution induzierte Abnahme der ATP-Affinität in NBF1 (mit Ausnahme eines Austausches F675R) jeweils ausreicht, um die Bindung in Gegenwart von bis zu 10 mM MgATP komplett aufzuheben. Mögliche Erklärung für die nur moderate Rechtsverschiebung des  $\text{EC}_{50}$  für MgATP zur Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 an F675R in Chimäre I<sub>Y1205A</sub> (s. Abb. 24) ist die Lokalisierung der Aminosäure in direkter Nachbarschaft zu einem weiteren aromatischen Rest. Tyrosin in Position 674 könnte bei Substitution des Phenylalanins die Funktion einer Stabilisierung des Nukleotid-Adeninrings übernehmen.

### 5.4.3 HI-analoge Mutationen

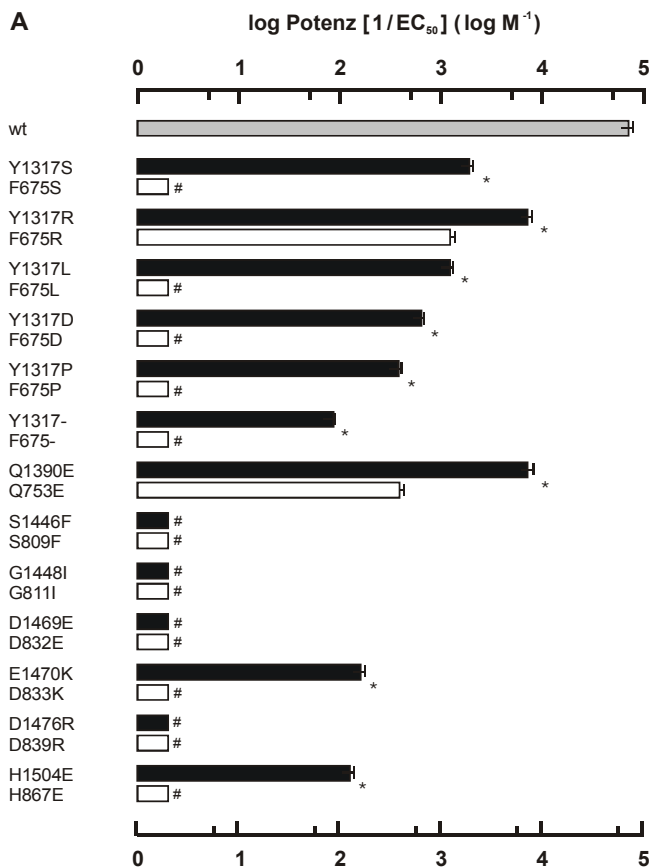
Um ein noch differenzierteres Bild zu erhalten, wurden HI-induzierende Mutationen in NBF2 des SUR2A eingebracht und ihre Auswirkung auf die MgATP-abhängige Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 erneut im Vergleich zu den homologen Mutationen in NBF1 analysiert (s. 4.3). Das Arginin R1316 bzw. Tyrosin Y674 stabilisiert vermutlich die für die Koordination des Adeninrings des Nukleotids kritische hochkonservierte aromatische Aminosäure. Während das Glutamat E1470 bzw. Aspartat D833 und Glycin in Pos. 1342 bzw. 701 an der Koordination des  $\gamma$ -Phosphats beteiligt ist, besitzen die Aminosäuren Serin in Pos. 1350 bzw. 709, Glycin in Pos. 1345 bzw. 704, Arginin in Pos. 1357 bzw. 716 und Valin in Pos. 1324 bzw. Threonin in Pos. 683 essentielle Bedeutung für die Orientierung des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phosphates von ATP. Die Argininreste, in den Positionen 1382 bzw. 745 und 1457 bzw. 820, sind kritisch für die Konformation der zweiten bzw. der sechsten  $\alpha$ -Helix. Die Reste Arginin in Pos. 1400 bzw. Glutamat in Pos. 763 sowie Glycin in Pos. 1442 bzw. 805 befinden sich jeweils in einer kurzen Sequenz vor der dritten bzw. sechsten Helix der Linker Region, deren Strukturen durch die Substitutionen vermutlich ebenso verändert werden, wie durch Insertion des Alanins in Pos. 1471 bzw. Prolins in Pos. 834 und Deletion von Leucinresten in den Positionen 1351 und 710 (s. Abb. 30 und 31).

Übereinstimmend zu den Ergebnissen bei den hochkonservierten Aminosäuren zeigte sich für die HI-analogen Mutationen, dass sie sowohl in der NBF2 als auch in der NBF1 entweder zu einer Rechtsverschiebung des EC<sub>50</sub> führten oder zu einem kompletten Verlust der ATP-induzierten [<sup>3</sup>H]P1075-Bindung. Ebenfalls übereinstimmend mit den Experimenten zu den hochkonservierten Aminosäuren zeigte sich dabei in der Regel, dass die Effekte auf den EC<sub>50</sub> für MgATP in NBF1 stärker ausgeprägt waren als in NBF2 (s. 4.3.1).

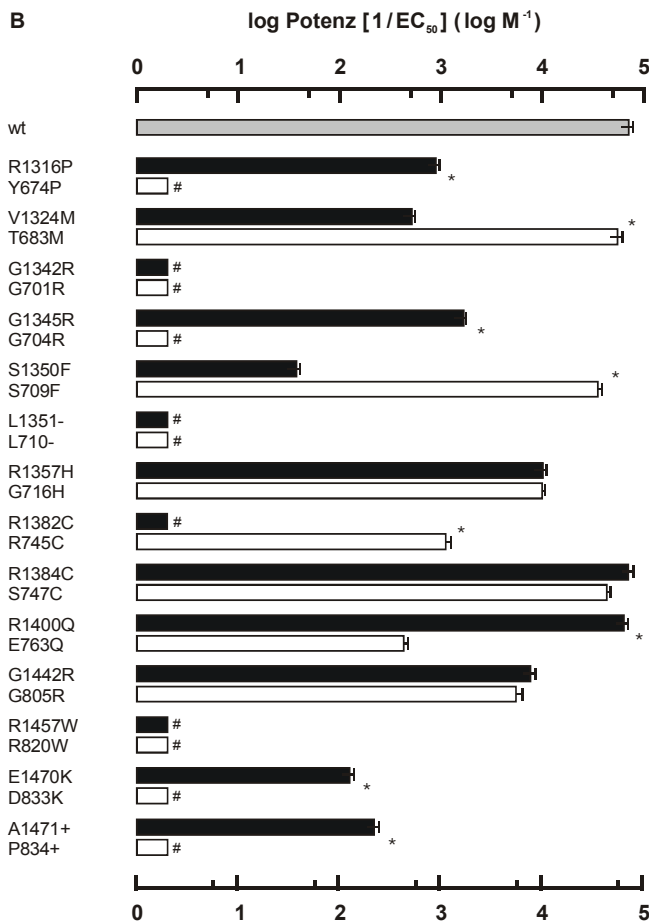
Diese Befunde zeigen, dass sich anhand der Analogmodelle für die NBF1 und NBF2 funktionelle Konsequenzen von Mutationen des SUR ableiten lassen, die z.B. eine Störung der Insulinsekretion (SUR1) oder kardiovaskuläre Erkrankungen (SUR2) erklären würden. Seitdem im Maus-Modell gezeigt werden konnte, dass ein SUR2<sup>-/-</sup> knock-out mit Ausbildung einer essentiellen Hypertonie und signifikant erhöhtem arrhythmogenen Potential sowie Koronarspasmen einhergeht (CHUTKOW et al., 2002), liegt es nahe zu vermuten, dass Mutationen in den NBFs des SUR2A bzw. SUR2B, die z.B. zu reduzierter oder aufgehobener Aktivierbarkeit des K<sub>ATP</sub>-Kanals durch NDPs führen, mit cardialen bzw. vaskulären Ereignissen assoziiert sein könnten.

#### 5.4.4 NBF1 fungiert als Hauptdeterminationsfaktor für den Konformationswechsel des SUR

Homologe Mutationen in den NBFs zeigen qualitativ symmetrische Effekte: Jede der untersuchten Mutationen, die in NBF2 zu einer Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP für die Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$  führte, induzierte auch in der jeweils homologen Position in NBF1 eine Rechtsverschiebung des  $EC_{50}$  für MgATP. Alle Mutationen in NBF2, die bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP zu einem kompletten Verlust der Bindung führten, induzierten mit Ausnahme einer HI-analogen Mutation, R1382C, auch in NBF1 eine vollständige Aufhebung der Bindung (s. Abb. 50). Quantitativ jedoch waren die Auswirkungen in den NBFs different: Die Effekte in NBF1 waren allermeist deutlich stärker ausgeprägt als in NBF2. In nahezu allen Fällen, in denen sich bei einer Mutation in NBF2 eine diskrete Abnahme der Potenz zeigte, wurde für die homologe Mutation in NBF1 mit Ausnahme von zwei weiteren HI-analogen Mutationen, V1324M und S1350F, eine noch stärkere Abnahme induziert. Diese Befunde sind erneut Indiz dafür, dass sich die Reduktion der Affinität für ATP in NBF1 stärker auf die Funktion des SUR auswirkt als eine Reduktion der Affinität in NBF2.



**Abb. 50** *Potenzen von MgATP zur Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$  an jeweils homologen Mutationen in den NBFs des SUR2A.* Diese Abbildung zeigt eine direkte Gegenüberstellung homologer Substitutionen hochkonservierter Aminosäuren (Teil **A** der Abb.) und HI-analoge Mutationen (Teil **B** der Abb.) in den NBFs der Chimäre I<sub>Y1205A</sub> und den Einfluss der Mutationen in NBF2 (als schwarzer Balken) bzw. NBF1 (als weißer Balken) auf die Potenz von MgATP zur Induktion der Bindung von  $[^3H]P1075$ . Zum Vergleich ist jeweils die Potenz der Chimäre I<sub>Y1205A</sub> dargestellt (wt, grauer Balken).



Die Potenzen für die Substitutionen, Insertionen und Deletionen wurden aus den  $EC_{50}$ -Werten der ATP-induzierten Bindung von  $[^3H]P1075$  errechnet (s. 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6, 4.2.7 und 4.3.1). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $N = 4-7$  unabhängigen Einzelexperimenten. # Falls sich bis zu einer Konzentration von 10 mM MgATP keine Bindung zeigte, wurde durch Approximation des theoretischen Kurvenverlaufs ein Maximalwert der Potenz abgeschätzt. \*  $p < 0,01$  für den Vergleich der homologen Mutationen in NBF2 und NBF1.

Ganz anders als aufgrund der asymmetrischen Verteilung der HI-induzierenden Mutationen zu vermuten war (s. Abb. 11), sprechen die Ergebnisse für eine weitgehende strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit der beiden NBFs. Sie stützen aber die Annahme, dass Mutationen in NBF1 funktionell kritischer sind als solche in NBF2. Die Ergebnisse sind einerseits deutliches Argument gegen ein Modell, das von einer klar asymmetrischen Funktion der NBFs ausgeht (s. Abb. 49), andererseits stützen die Befunde das sogenannte Schaltermodell des SUR, in dem von einer weitgehend symmetrischen Funktion der beiden NBFs ausgegangen wird (SCHWANSTECHER et al., 1998; SIEVERDING 1998b). Ähnlich wie bei regulatorischen GTPasen (WITTINGHOFFER und PAI, 1991; ABEL et al., 1996), würde die ATP-Bindung und -Hydrolyse in beiden NBFs den Rezeptor demnach in einen Zustand schalten, der sensitiv ist gegenüber KCOs und NDPs. Mögliche Erklärung für die Funktion der beiden NBFs des SUR sind - z.B. in Analogie zur Energetisierung des Substanztransportes des P-Glycoproteins - alternierende katalytische Zyklen (SENIOR und GADSBY, 1997; SAUNA und AMBUDKAR, 2001), die den SUR aus seiner für KCOs und NDPs insensitiven „off“-Konformation in den „on“-Zustand schalten.

Trotz einer weitgehenden qualitativen Parallelität der Ergebnisse für die funktionelle Auswirkung der Substitutionen in den NBFs waren die Effekte in NBF1 in der Regel stärker ausgeprägt als in NBF2. Diese Resultate sind insgesamt klares Indiz dafür, dass sich eine Hemmung der hydrolytischen Aktivität in NBF1 stärker auf die Funktion des SUR auswirkt, als eine Hemmung der Aktivität in NBF2. Das heißt in anderen Worten, dass der übergeordnete Determinierungsfaktor für die hochaffine Bindung von KCOs und somit auch für das Schalten des SUR aus der insensitiven in die für KCOs und NDPs sensitive Konformation die NBF1 darstellt. Transferiert man diese Befunde in ein mathematisches Modell (6), würde ein Konformationswechsel und damit die hochaffine Bindung z.B. nur dann erreicht, wenn ein Schwellenwert (E) überschritten wird:

$$(6) \quad E = (\underbrace{x \cdot A}_{\text{NBF1}}) + (\underbrace{y \cdot B}_{\text{NBF2}})$$

Dieser Wert (E) wird erreicht als Summe zweier Produkte, wobei Summand 1 als NBF1 und Summand 2 als NBF2 auftritt. Jeder der Summanden besteht aus einem Produkt einer variablen Komponente (x bzw. y), in die jeweils sowohl die Affinität für die Bindung von Nukleotiden, die ATPase-Aktivität als auch die in NBF1 und NBF2 induzierte Konformationsänderung des SUR eingeht und einer Konstanten (A bzw. B), welche die Auswirkung der Konformationsänderung in NBF1 bzw. NBF2 auf die Affinitäts-induzierende Konformationsänderung des SUR beschreibt. Diese Konstante könnte für NBF1 (A) größer sein als für NBF2 (B), so dass Änderungen bezüglich der ATP-Bindung und -Hydrolyse als auch Abweichungen für die Konformationsänderung durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen in NBF1 von stärkerer Bedeutung sind, um den Schwellenwert (E) zu erreichen bzw. kritischere Bedeutung zeigen für die Aktivierung von  $K_{\text{ATP}}$ -Kanälen durch KCOs und NDPs. Dies deutet zum einen darauf hin, dass die Einbindung der beiden NBFs in das Gesamtprotein leicht variiert. Zum anderen ist ein stärkerer negativer Selektionsdruck von HI-Mutationen in NBF1 mögliche Erklärung dafür, dass sie wesentlich seltener beobachtet werden.

## **5.5 Funktionelle Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs**

### **5.5.1 Die Bindungsstellen sind separat und strikt negativ-allosterisch gekoppelt**

SUs und KCOs entfalten ihre Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal über Bindungsstellen (sites) auf dem SUR (SCHWANSTECHEER et al., 1994; SCHWANSTECHEER et al., 1998; s.a. 1.8.3). Diese sites sind innerhalb der zweiten transmembranären Domäne (TMDII) lokalisiert (UHDE et al., 1999; TOMAN, 2001; s.a. 1.8.3.1, 1.8.3.2). Der Nachweis der Existenz eines zeitweiligen ternären Komplexes bestehend aus SUR und daran gebundenem SU Glibenclamid und KCO P1075 zeigte, dass die sites völlig separat sind und sich nicht überlappen (TOMAN, 2001). Diese Bindungsstellen sind über einen strikt negativ-allosterischen Mechanismus aneinander gekoppelt (SCHWANSTECHEER und RIETZE, 1990; SCHWANSTECHEER et al., 1991a; 1991b; 1992a; 1992b; 1992d; 1998; DÖRSCHNER et al., 1999; s.a. 1.8.3.3).

Letztlich ungeklärt war dabei allerdings, über welche Bereiche des SUR die Kopplung der sites vermittelt wird. Durch Konstruktion unterschiedlicher chimärer Rezeptoren konnte zunächst der C-Terminus des SUR als kritisch für die allosterische Interaktion identifiziert werden (TOMAN, 2001; s.a. 4.4.2.1). Um für die Interaktion des C-Terminus essentielle Bereiche des Rezeptors zu identifizieren, wurden systematisch weitere Chimären erzeugt und somit kritische Regionen des SUR durch analoge Bereiche anderer Isoformen der SURs substituiert. Diese Konstrukte wurden in [ $^3H$ ]Radioligandbindungsstudien auf ihre allosterische Wechselwirkung untersucht. Führt ein Transfer einer Region des SUR trotz unveränderter Affinitäten für die Bindung von SUs und KCOs zu einer Modulierung der allosterischen Interaktion, so ist es sehr wahrscheinlich, dass der substituierte Bereich kritische Bedeutung für die Kopplung des sites besitzt.

### **5.5.2 Weite Bereiche des SUR besitzen keine Bedeutung für die Interaktion der sites**

Ausgehend von den nativen Isoformen SUR1 und SUR2A mit jeweils intakter Kopplung der sites, konnte die jeweils N-terminale Hälfte des SUR, bestehend aus den ersten beiden transmembranären Domänen und NBF1 durch korrespondierende Bereiche der anderen Isoform ohne Verlust der allosterischen Interaktion ausgetauscht werden (Chimären IV und V; s. 4.4.2.2). Wir folgerten daher, dass TMD0, TMDI und auch NBF1 vermutlich keine Bedeutung für die Kopplung besitzen.

Um innerhalb der C-terminalen Hälfte des Rezeptors die kritischen Regionen weiter einzugrenzen, wurden die Bereiche für die hochaffine Bindung von KCOs in SUR1

(Chimäre VI; UHDE et al., 2001) eingebracht, die ersten beiden transmembranären Regionen der TMDII substituiert (Chimäre VIII) und zusätzlich die NBF2 ausgetauscht (Chimäre IX). Auch diese Substitutionen blieben ohne Einfluss auf die Interaktion (s. 4.4.2.3). Wir folgerten daher weiter, dass ebenso KCOI, KCOII, die TMR12 und 13 als auch NBF2 keine Bedeutung für die Kopplung der sites zu besitzen scheinen.

### **5.5.3 Die SUBR ist kritisch für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen**

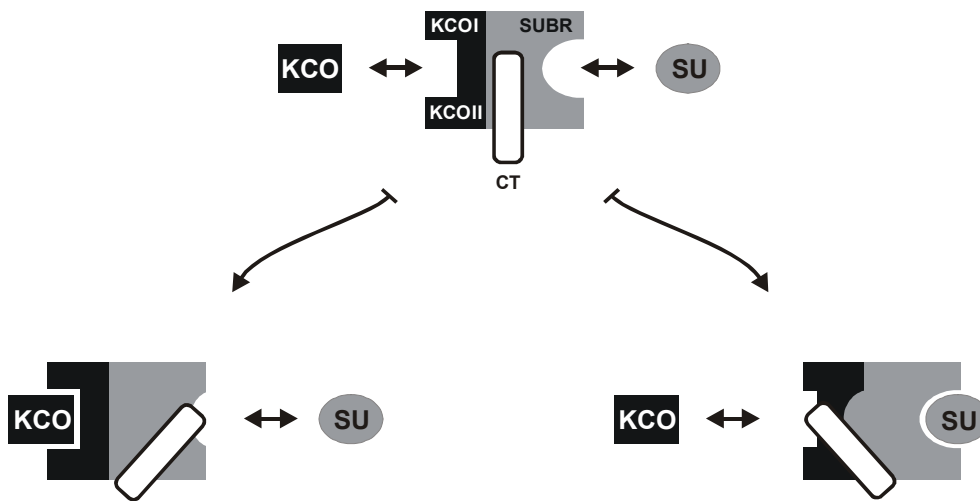
Durch Variation der SUBR jedoch konnte eine Modulierung der negativ-allosterischen Interaktion erreicht werden. Der Transfer der SUBR des SUR1 in SUR2B führte zu einer Chimäre (Chimäre III; s. 4.4.2.1; 4.4.2.4), die analog zu Chimäre II beide Bindungsstellen für SUs und KCOs in hochaffiner Form besitzt. Die Charakterisierung der allosterischen Interaktion der sites ergab jedoch, dass bis zu einer Konzentration von 10  $\mu$ M weder [ $^3$ H]Glibenclamid durch Pinacidil, noch [ $^3$ H]P1075 durch Glibenclamid verdrängt werden konnte. Der Transfer der SUBR von SUR1 in SUR2B führte also zu einer Chimäre mit hochaffinen Bindungsstellen für beide Liganden, aber komplettem Verlust der negativ-allosterischen Interaktion.

Ein identisches Bild zeigte sich beim Transfer der SUBR des SUR1 in Chimäre VII (4.4.2.4). Erneut konnte durch Übertragung der SUBR unter Konservierung der hochaffinen Bindungsstellen für beide Liganden eine komplette Aufhebung der Kopplung induziert werden (Chimäre X; s. 4.4.2.4). SUR2B und Chimäre III bzw. Chimäre VII und Chimäre X unterscheiden sich jeweils lediglich in der SUBR, die durch den entsprechenden Bereich des SUR1 substituiert wurde. Diese Ergebnisse sind deshalb klares Indiz dafür, dass neben dem C-Terminus (TOMAN, 2001) auch die SUBR kritische Bedeutung für die negativ-allosterische Interaktion der Bindungsstellen auf SURs besitzt.



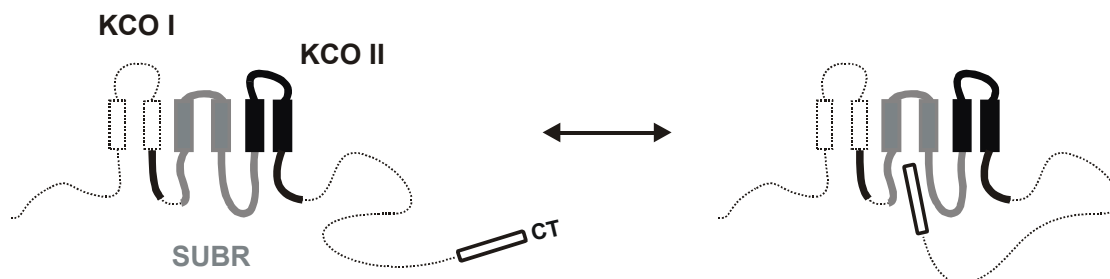
#### 5.5.4 Modell der Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs

Diese Befunde stützen somit insgesamt die Hypothese, dass die negativ-allosterische Interaktion der Bindungsstellen für Pharmaka auf  $K_{ATP}$ -Kanälen über zwei Regionen des SUR vermittelt wird. Damit ergibt sich das folgende Modell für die Kopplung der sites (Abb. 51): SURs tragen zwei separate Bindungsstellen für SUs und KCOs, die über einen negativ-allosterischen Mechanismus gekoppelt sind (s.a. 1.8.3.3). Für die funktionelle Wechselwirkung dieser sites besitzen dabei zwei Regionen eine Schlüsselfunktion: der C-Terminus (TOMAN, 2001) und die SUBR. Bei physiologischer Konstellation, entsprechend einer funktionellen Einheit von C-Terminus und SUBR, könnte eine Interaktion dieser Regionen dazu führen, dass der C-Terminus bei Besetzung der Bindungsstelle für KCOs bzw. für SUs jeweils so verlagert wird, dass die Bindungsstellen für SUs bzw. für KCOs nicht gleichzeitig besetzt werden können.



**Abb. 51** Die Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs wird über die SUBR und den C-Terminus vermittelt. Wird der SUR an der KCO-site durch KCOs besetzt, führt eine Konformationsänderung des C-Terminus (CT) und der SUBR dazu, dass die SUBR nicht gleichzeitig durch SUs besetzt werden kann und umgekehrt (für weitere Details siehe: Text).

Mögliche Erklärung für den molekularen Mechanismus der allosterischen Kopplung ist eine direkte Interaktion der SUBR und des C-Terminus wie in Abb. 52 analog zum „ball and chain“-Mechanismus des Gatings dargestellt (ARMSTRONG und BEZANILLA, 1977; BEZANILLA und ARMSTRONG, 1977; HOSHI et al., 1990; ZAGOTTA et al., 1990).



**Abb. 52** Interaktion der Bindungsstellen könnte über direkte Interaktion des C-Terminus (CT) mit der SUBR vermittelt werden (für weitere Details siehe: Text).

### 5.5.5 Identifizierung von Aminosäuren mit kritischer Bedeutung für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen

#### 5.5.5.1 Eine Aminosäure in der SUBR besitzt Schlüsselfunktion

Eine aus 114 Aminosäuren bestehende Region innerhalb der TMDII von SURs - die SUBR - besitzt, wie in 4.4.2.4 gezeigt, kritische Bedeutung für die negativ-allosterische Kopplung der Bindungsstellen für SUs und KCOs. Um innerhalb dieser Region Aminosäuren mit Schlüsselfunktion für die Kopplung der sites zu identifizieren, wurden - ausgehend von Chimäre X, welche die SUBR des SUR1 beinhaltet - einzelne Aminosäuren der SUBR gegen analoge Reste des SUR2A substituiert. Ziel war es, den durch den Transfer der SUBR von SUR1 induzierten Verlust der allosterischen Interaktion durch eine singuläre Substitution innerhalb der SUBR wieder aufzuheben.

Eine systematische Punktmutationsanalyse ergab, dass von den 31 unterschiedlichen Aminosäuren (s. 4.4.3) in der SUBR von SUR1 und SUR2A nur ein Rest, das Cystein in Pos. 1175 (SUR1) bzw. Phenylalanin in Pos. 1142 (SUR2A), kritische Bedeutung für die Kopplung der Bindungsstellen besitzt. So konnte durch Substitution des Cysteins in SUR1 gegen die Aminosäure des SUR2A die allosterische Interaktion partiell wiederhergestellt werden. Während die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil nur inkomplett war (Die prozentuale Verdrängbarkeit erreichte mit lediglich 11 % einen Wert, der sich einerseits zwar

deutlich vom Ausgangskonstrukt (Chimäre X) unterschied, andererseits jedoch in der gleichen Größenordnung für weitere Substitutionen detektiert werden konnte), zeigte sich für die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch Glibenclamid mit über 96 % eine fast vollständige Hemmung der Bindung (s. 4.4.3.2). Die partielle Wiederherstellung der Interaktion stand dabei in Einklang mit der Annahme einer Rekonstitution der Kopplung der Bindungsstellen für SUs und KCOs durch eine singuläre Substitution in der SUBR. Andererseits waren diese Ergebnisse ebenfalls mit der Annahme einer Modulierung der Affinitäten von SUs und / oder KCOs durch diese Mutation vereinbar. So weist z.B. eine weitere Aminosäure der SUBR in Pos. 1238 des SUR1 (Serin) bzw. in Pos. 1205 des SUR2A (Tyrosin) besondere Bedeutung für die Bindung von SUs auf (TOMAN, 2001). Ferner konnte an einem weiteren ABC-Protein, dem humanen P-Glycoprotein, für eine zu C1175 (SUR1) bzw. F1142 (SUR2A) homologe Aminosäure (s. Abb. 41) eine kritische Bedeutung für die Ausbildung der Substrat-bindenden Domäne nachgewiesen werden (LOO und CLARKE, 2000).

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Affinitäten beider Liganden in kompetitiven Verdrängungsexperimenten an Chimäre X in An- und Abwesenheit der Substitution C1175F vergleichend untersucht. Jeweils deckungsgleiche Kurvenverläufe zeigten hierbei, dass die Affinitäten für SUs und KCOs durch die Substitution unbeeinflusst blieben (4.4.3.3). Sie bestätigen damit die Annahme, dass der Aminosäure C1175 (SUR1) bzw. F1142 (SUR2A) eine Schlüsselfunktion für die allosterische Interaktion der Bindungsstellen zukommt.

#### **5.5.5.2    *Variation der allosterischen Interaktion durch differente Substitutionen in Position 1175***

Zur weiteren Charakterisierung dieser für die Kopplung der sites kritischen Aminosäure wurde eine Serie unterschiedlicher Substituenten in dieser Position eingebracht und diese Konstrukte jeweils auf die allosterische Wechselwirkung untersucht. Dabei konnte die Sonderstellung der Aminosäure in Pos. 1175 (SUR1) bzw. 1142 (SUR2A) bestätigt werden. Während die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil mit dem Austausch gegen weitere aromatische Aminosäuren und Heterozyklen bzw. basische und aliphatische Reste nur geringfügig gesteigert werden konnte (s.a. 4.4.3.4 A), induzierten die Substitutionen gegen Glutamat und Aspartat mit 53 % bzw. 61 % eine deutliche Zunahme der Verdrängbarkeit des [<sup>3</sup>H]Radioliganden (s. Abb. 43). Das Einbringen negativ geladener Seitenketten in dieser Position scheint hierbei offenbar die negativ-allosterische Interaktion der Bindungsstellen zu begünstigen.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Glibenclamid auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 zeigte sich ein ganz anderes Bild (s.a. 4.4.3.4 B). Einerseits führten die Austausche des Cysteins gegen Tyrosin bzw. Tryptophan in Analogie zur Substitution C1175F in Chimäre X ebenfalls jeweils zu einer deutlichen Zunahme der Verdrängbarkeit des KCO, andererseits zeigte sich jedoch bei der Charakterisierung der weiteren Substitutionen zu sowohl negativ bzw. positiv geladenen Resten (Glutamat und Aspartat bzw. Arginin, Lysin und Histidin) als auch zu Isoleucin - einer aliphatischen Aminosäure - überraschenderweise keine Zunahme der Verdrängbarkeit von [ $^3\text{H}$ ]P1075, sondern eine zusätzliche Induktion der Bindung durch die Zugabe des allosterischen Liganden (s. Abb. 44). Ein Effekt, der mit einer über 100 %igen Steigerung der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch 100 nM Glibenclamid bei der Substitution C1175K in Chimäre X am stärksten ausgeprägt war.

Um hierbei einen Einfluss der Substitution auf die Affinitäten von SUs und / oder KCOs auszuschließen, wurden analog zur Charakterisierung des Austausches C1175F in Chimäre X (s.a. 4.4.3.2; 4.4.3.3; 5.5.5.1) in kompetitiven Verdrängungsbindungsexperimenten die Affinitäten der Liganden untersucht. Nahezu identische Kurvenverläufe und halbmaximal-inhibitorische Konzentrationen für beide Liganden auch in Anwesenheit der allosterischen Moleküle (s.a. 4.4.3.5) zeigen, dass eine Modulierung der Affinitäten durch die Mutation C1175K ausgeschlossen werden kann und sind damit erneut klares Indiz dafür, dass diesem Aminosäurerest in der SUBR eine zentrale Rolle in der Regulation der allosterischen Interaktion der Bindungsstellen für SUs und KCOs zukommt.

So kann ohne Einfluss auf die jeweilige Affinität der Liganden durch eine singuläre Substitution die allosterische Kopplung der sites moduliert werden. Substitutionen in der Pos. 1175 (SUR1) bzw. in Pos. 1142 (SUR2A) induzieren ein An- und Ausschalten der negativ-allosterischen Interaktion und auch Umwandlung der negativ-allosterischen Wechselwirkung in eine positiv-allosterische Kopplung der sites.

#### **5.5.6 Der SUR besitzt vermutlich eine weitere Bindungsstelle für SUs mit niedriger Affinität**

Um den Effekt der Glibenclamid-vermittelten Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 näher zu analysieren, wurde der Einfluss steigender Konzentrationen von Glibenclamid auf die Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 untersucht. Erstaunlicherweise ergab die Detailanalyse der allosterischen Interaktion von C1175K in Chimäre X, dass einer Induktion der Bindung von [ $^3\text{H}$ ]P1075 durch steigende Konzentrationen an Glibenclamid eine fast vollständige Verdrängung des

Radioliganden folgte (s.a. 4.4.3.6). Die resultierende Bindungskurve zeigte einen zweiphasigen Verlauf mit Induktion der Bindung bis ca. 100 nM Glibenclamid - der  $EC_{50}$  lag bei ca. 20 nM - und Verdrängung des Radioliganden bei höheren Konzentrationen des SU mit einem  $IC_{50}$  bei ca. 0,6  $\mu$ M (s.a. Abb. 46). Dieser atypische Kurvenverlauf konnte auch für die Substitutionen gegen Glutamat und Aspartat bzw. Arginin, Lysin und Histidin als auch Isoleucin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Verdrängung von [ $^3$ H]P1075 durch hohe Konzentrationen von Glibenclamid ist Indiz für die Existenz einer weiteren Bindungsstelle für SUs mit niedriger Affinität. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Einfluss von Glibenclamid auf die Dissoziationskinetik von [ $^3$ H]P1075 und Chimäre X-C1175K durch Pinacidil untersucht. Dabei zeigte sich, dass die additive Zugabe von 10  $\mu$ M Glibenclamid die Dissoziation des Komplexes aus [ $^3$ H]P1075 und Chimäre X-C1175K durch 100  $\mu$ M Pinacidil drastisch beschleunigte. Dieser Befund ist mit einer kompetitiven Interaktion nicht vereinbar. Er zeigt, dass auf dem SUR vermutlich eine zweite niederaffine Bindungsstelle für SUs vorhanden ist, die ebenfalls in negativ-allosterischer Weise mit der Bindungsstelle für KCOs interagiert.

## 6 Zusammenfassung

K<sub>ATP</sub>-Kanäle bestehen aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten, einer porenbildenden einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Untereinheit (K<sub>IR</sub>6.1 oder K<sub>IR</sub>6.2) und einer regulatorischen Untereinheit, dem Sulfonylharnstoffrezeptor (SUR). Bislang wurden drei Isoformen des SUR kloniert: SUR1, die regulatorische Untereinheit des K<sub>ATP</sub>-Kanals der B-Zelle des Pankreas und die kardiovaskulären Subtypen des SUR2: SUR2A und SUR2B.

SURs gehören zur Familie der ABC-Transporter und zeigen eine Membrantopologie aus drei membranären Domänen: TMD0, TMDI und TMDII. Der N-Terminus ist extrazellulär lokalisiert, intrazellulär finden sich sowohl der C-Terminus als auch die Nukleotid-bindenden Untereinheiten NBF1 und NBF2. Zahlreiche Mutationen im gesamten SUR sind ursächlich für die hyperinsulinämische Hypoglykämie des Kleinkindes (HI). Während in NBF1 nur sehr wenige Austausche bekannt sind, die mit HI assoziiert sind, finden sich über 60 % der krankheitsinduzierenden Mutationen in NBF2.

Für die Funktionen der NBFs in SURs werden derzeit zwei Modelle diskutiert: Ein asymmetrisches Modell mit Interaktion von NTPs in NBF1 und NDPs in NBF2 bzw. ein Modell mit symmetrischer Funktion der NBFs, bei dem angenommen wird, dass alternierende katalytische Zyklen aus ATP-Bindung und -Hydrolyse in den NBFs den SUR aus seiner für KCOs und NDPs insensitiven „off“-Konformation in den sensitiven „on“-Zustand schalten. Ziel der Untersuchungen war es, diese Modelle zu prüfen und die derzeitigen Vorstellungen über die funktionelle Relevanz der NBFs zu verbessern.

Da die Aufklärung der Tertiärstrukturen der NBFs des SUR bislang nicht gelungen ist, wurden Homologie-Modelle der beiden NBFs auf Basis einer Röntgenstrukturanalyse des eng verwandten Nukleotid-bindenden Proteins von TAP1 abgeleitet. Eine ca. 30 %ige Übereinstimmung der Aminosäure-(AS)-Sequenzen von den NBFs des SUR und des TAP1 war Indiz dafür, dass sich die Tertiärstrukturen nicht wesentlich unterscheiden. Konform dazu, ergab sich in den errechneten 3D-Modellen eine zur NBF des TAP1 jeweils nahezu identische Raumstruktur. Zur Analyse der strukturellen Abweichungen der NBFs des SUR wurden die Analogmodelle für NBF1 und NBF2 überlagert. Dabei zeigten sich die Modelle der beiden NBFs strukturell mit einer über 95 %igen Übereinstimmung nahezu kongruent. Die NBFs von SURs besitzen also zum einen jeweils eine Tertiärstruktur, die mit der von TAP1 weitgehend übereinstimmt, zum anderen zeigen sich die NBF1 und NBF2 von SURs strukturell weitreichend symmetrisch.

Aus den strukturellen Daten diverser ABC-Transporter und Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Relevanz waren AS mit kritischer Bedeutung für die Funktion einer NBF bekannt. Die Lokalisierung dieser hochkonservierten Reste wurde in den erstellten 3D-Modellen für die NBFs des SUR2A abgeleitet. Analog zu den Daten für die NBFs weiterer Transporter zeigte sich, dass diese AS entweder speziell exponiert waren oder dass eine Schlüsselfunktion für die Bindung von ATP bzw. für eine Konformationsänderung nach erfolgter ATP-Hydrolyse abgeleitet werden konnte. Diese Modelle wurden durch Mutationsanalysen in Radioligandbindungsstudien experimentell getestet und die funktionelle Relevanz dieser hochkonservierten AS durch den Einfluss von Substitutionen auf die MgATP-abhängige Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 untersucht. Die Substitutionen der hochkonservierten AS induzierten sowohl in NBF1 als auch in NBF2 jeweils entweder eine deutliche Rechtsverschiebung des EC<sub>50</sub> für MgATP zur Induktion der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 oder es zeigte sich ein kompletter Verlust der Bindung. In Einklang zu früheren Experimenten waren in NBF1 die Effekte auf den EC<sub>50</sub> für MgATP deutlich stärker ausgeprägt als in NBF2.

Um ein noch differenzierteres Bild zu erhalten, wurden HI-analoge Mutationen in NBF1 und NBF2 des SUR2A homolog eingebracht, ihre Lokalisierung im 3D-Modell errechnet und die Auswirkung auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 vergleichend analysiert. Konform zu den Ergebnissen bei den hochkonservierten AS, zeigte sich eine Lokalisation der HI-analogen Mutationen in funktionell kritischen Positionen. Substitutionen auch dieser AS führten in beiden NBFs entweder zu einer Rechtsverschiebung des EC<sub>50</sub> oder zu einem kompletten Verlust der hochaffinen [<sup>3</sup>H]P1075-Bindung. Ebenfalls übereinstimmend mit den Experimenten zu den hochkonservierten AS zeigte sich dabei in der Regel, dass die Effekte auf den EC<sub>50</sub> für MgATP in NBF1 stärker ausgeprägt waren als in NBF2.

Diese Befunde zeigen, dass sich anhand der Analogmodelle für die NBFs des SUR funktionelle Konsequenzen von Mutationen ableiten lassen, die z.B. eine Störung der Insulinsekretion (SUR1) oder kardiovaskuläre Erkrankungen (SUR2) erklären würden. Ganz anders als aufgrund der asymmetrischen Verteilung der HI-induzierenden Mutationen zu vermuten war, sprechen die Ergebnisse für eine weitgehende strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit der beiden NBFs. Sie stützen aber die Annahme, dass Mutationen in NBF1 funktionell kritischer sind als solche in NBF2. Einerseits sind diese Ergebnisse deutliches Argument gegen ein Modell, das von einer klar asymmetrischen Funktion der NBFs ausgeht, andererseits stimmen die Befunde mit dem sogenannten Schaltermodell des SUR überein, in dem von einer weitgehend symmetrischen Funktion der beiden NBFs ausgegangen wird.

Trotz einer weitreichenden Parallelität für die funktionellen Auswirkungen der Substitutionen waren die Effekte in NBF1 in der Regel stärker ausgeprägt als in NBF2. Diese Resultate sind klares Indiz dafür, dass sich eine Hemmung der hydrolytischen Aktivität in NBF1 stärker auf die Funktion des SUR auswirkt, als eine Hemmung der Aktivität in NBF2. Die NBF1 stellt somit vermutlich den übergeordneten Determinierungsfaktor für die hochaffine Bindung von KCOs und somit auch für das Schalten des SUR aus der insensitiven in die für KCOs und NDPs sensitive Konformation dar. Die unterschiedliche Bedeutung der NBFs für die Konformationsänderung deutet auf eine differente Einbindung der NBFs in das Gesamtprotein hin. Übereinstimmend mit den Befunden könnte die Tatsache, dass HI-Mutationen wesentlich seltener in NBF1 beobachtet werden, darauf zurückzuführen sein, dass sie zu einem deutlich stärkeren negativen Selektionsdruck führen.

SUs und KCOs entfalten ihre Wirkung auf den  $K_{ATP}$ -Kanal über Bindungsstellen auf dem SUR. Die Bindungsstelle für SUs (SUBR) und die sites für KCOs (KCOI und KCOII) sind innerhalb der TMDII lokalisiert und über einen strikt negativ-allosterischen Mechanismus aneinander gekoppelt. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass der C-Terminus des SUR essentielle Bedeutung für die Kopplung besitzt. Um die molekularen Mechanismen der allosterischen Interaktion näher zu charakterisieren und weitere beteiligte Protein-Regionen zu identifizieren, wurde systematisch eine Serie von Chimären konstruiert und in Radioligandenbindungsstudien der Einfluss der Austausche auf die allosterische Wechselwirkung analysiert.

Dabei zeigte sich, dass die TMD0, TMDI und auch NBF1 des SUR durch jeweils korrespondierende Bereiche anderer Isoformen ohne Verlust der allosterischen Interaktion ausgetauscht werden konnte, als Indiz dafür, dass die N-terminale Hälfte des SUR vermutlich keine Bedeutung für die Kopplung besitzt. Um innerhalb der C-terminalen Hälfte des SUR die kritischen Regionen weiter einzugrenzen, wurden KCOI und KCOII in SUR1 eingebracht, die beiden ersten TMRs der TMDII substituiert und zusätzlich NBF2 ausgetauscht. Auch diese Substitutionen blieben ohne Einfluss auf die Interaktion, als Hinweis darauf, dass weite Bereiche der TMDII vermutlich ebenfalls keine Bedeutung für die Kopplung der Bindungsstellen besitzen.

Durch Variation der SUBR ließ sich die negativ-allosterische Interaktion jedoch beeinflussen. Der Transfer der SUBR von SUR1 in SUR2B führte zu einer Chimäre (III) mit hochaffinen Bindungsstellen für beide Liganden, aber komplettem Verlust der negativ-allosterischen Interaktion. Ein identisches Bild zeigte sich beim Transfer der SUBR des SUR1 in Chimäre VII (X). SUR2B und Chimäre III bzw. die Chimären VII und X unterscheiden sich



jeweils lediglich in der SUBR. Diese Ergebnisse sind deshalb klares Indiz dafür, dass neben dem C-Terminus auch die SUBR kritische Bedeutung für die negativ-allosterische Interaktion der Bindungsstellen auf SURs besitzt. Mögliche Erklärung für den molekularen Mechanismus der allosterischen Kopplung könnte analog zum „ball and chain“-Mechanismus des Gatings eine direkte Interaktion der SUBR und des C-Terminus sein.

Innerhalb der 114 AS umfassenden SUBR konnte eine AS, C1175 (SUR1) bzw. F1142 (SUR2A), identifiziert werden, die eine Schlüsselfunktion für die Kopplung der Bindungsstellen besitzt. Ausgehend von Chimäre X (SUBR des SUR1), mit aufgehobener Kopplung der sites, führte die Substitution des Cysteins in Position 1175 gegen das homologe Phenylalanin in SUR2A zu einer partiellen Wiederherstellung der Interaktion. Während die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil mit 11 % nur inkomplett war, zeigte sich für die Verdrängung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch Glibenclamid mit über 96 % eine fast vollständige Hemmung der Bindung.

Zur weiteren Charakterisierung dieser für die Kopplung kritischen AS wurde eine Serie unterschiedlicher Substituenten eingebracht. Nur die Austausche gegen negativ geladene Reste (E und D) induzierten eine deutliche Zunahme der Verdrängbarkeit von [<sup>3</sup>H]Glibenclamid durch Pinacidil (53 % und 61 %).

Bei der Untersuchung des Einflusses von Glibenclamid auf die Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 zeigte sich, dass zahlreiche Austausche überraschenderweise nicht zu einer Zunahme der Verdrängbarkeit von [<sup>3</sup>H]P1075 führten, sondern zu einer zusätzlichen Induktion der Bindung. Ein Effekt, der mit einer über 100 %igen Steigerung der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch 100 nM Glibenclamid bei C1175K am stärksten ausgeprägt war. Ein Einfluss der Substitutionen auf die Affinitäten der Liganden konnte in Kontrollexperimenten jeweils ausgeschlossen werden.

Diese Befunde zeigen, dass durch eine singuläre Substitution in der SUBR ein Ein- und Ausschalten der Kopplung induziert und auch eine Umwandlung der negativ-allosterischen Wechselwirkung in eine positiv-allosterische Interaktion der sites erreicht werden kann. Eine Detailanalyse ergab, dass einer Induktion der Bindung von [<sup>3</sup>H]P1075 durch steigende Konzentrationen an Glibenclamid eine fast vollständige Verdrängung des Radioliganden folgte. Die resultierende Bindungskurve zeigte einen zweiphasigen Verlauf mit Induktion der Bindung bis ca. 100 nM Glibenclamid und Verdrängung des Radioliganden bei höheren Konzentrationen. Wir haben dies als Indiz für die Existenz einer weiteren Bindungsstelle für Glibenclamid mit niedriger Affinität interpretiert.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde der Einfluss von Glibenclamid auf die Dissoziationskinetik von [ $^3\text{H}$ ]P1075 und Chimäre X-C1175K durch Pinacidil untersucht. Dabei zeigte sich, dass die additive Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Glibenclamid die Dissoziation des Komplexes aus [ $^3\text{H}$ ]P1075 und Chimäre X-C1175K durch 100  $\mu\text{M}$  Pinacidil drastisch beschleunigte. Da dieser Befund mit einer kompetitiven Interaktion nicht vereinbar ist, stützt er die Schlussfolgerung, dass auf dem SUR vermutlich eine zweite niederaffine Bindungsstelle für SUs vorhanden ist, die ebenfalls in negativ-allosterischer Weise mit der Bindungsstelle für KCOs interagiert.

## 7 Literaturverzeichnis

- ABEL K, YODER MD, HILGENFELD R, JURNAK F (1996): An alpha to beta conformational switch in EF-Tu. *Structure* **4**, 1153 - 1159.
- AGUILAR-BRYAN L, NICHOLS CG, WECHSLER SW, CLEMENT JP IV, BOYD AE III, GONZALEZ G, HERRERA-SOSA H, NGUY K, BRYAN J, NELSON DA (1995): Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin-secretion. *Science* **268**, 423 - 426.
- AGUILAR-BRYAN L, CLEMENT JP IV, GONZALEZ G, KUNJILWAR K, BABENKO A, BRYAN J (1998): Toward understanding the assembly and structure of K<sub>ATP</sub>-channels. *Physiol Rev* **78**, 227 - 245.
- AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1999): Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *Endocrine Rev* **20**, 101 - 135.
- ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ (1990a): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403 - 410.
- ALTSCHUL SF, LIPMAN DJ (1990b): Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5509 - 5513.
- ARMSTRONG CM, BEZANILLA F (1977): Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* **70**, 567 - 590.
- ASHCROFT FM, RORSMAN P (1989): Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog Biophys Mol Biol* **54**, 87 - 143.
- ASHCROFT SJH, ASHCROFT FM (1992): The sulfonylurea receptor. *Biochem Biophys Acta* **1175**, 45 - 59.
- ASHFIELD R, GRIBBLE FM, ASHCROFT SJ, ASHCROFT FM (1999): Identification of the high-affinity tolbutamide site on the SUR1 subunit of the K(ATP) channel. *Diabetes* **48**, 1341 - 1347.
- ASHFORD MLJ (1990): Potassium channels and modulation of insulin secretion. In: *Potassium channels: Structure, classification, function and therapeutic potential*; hrsg. v. Cook NS; Ellis Horwood, Chichester: 300 - 325.
- AYNSLEY-GREEN A, HUSSAIN K, HALL J, SAUDUBRAY JM, NIHOUL-FEKETE C, DE LONLAY-DEBENEY P, BRUNELLE F, OTONKOSKI T, THORNTON P, LINDLEY KJ (2000): Practical management of hyperinsulinism in infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **82**, F98 - F107.
- BABENKO AP, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1998): Reconstituted human cardiac KATP channels: functional identity with the native channels from the sarcolemma of human ventricular cells. *Circ Res* **83**, 1132 - 43.

- BAS F, DARENDELILER F, DEMIRKOL D, BUNDAK R, SAKA N, GUNOZ H (1999): Successful therapy with calcium channel blocker (nifedipine) in persistent neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *J Pediatr Endocrinol Metab* **12**, 873 - 878.
- BECKER B, ANTOINE MH, NGUYEN QA, RIGO B, COSGROVE KE, BARNES PD, DUNNE MJ, PIROTE B, LEBRUN P (2001): Synthesis and characterization of a quinolinonic compound activating ATP-sensitive K(+) channels in endocrine and smooth muscle tissues. *Br J Pharmacol* **134**, 375 - 385.
- BENNETT JP (1978): Methods in binding studies. In: Neurotransmitter receptor binding; hrsg. v. Yamamura HI, Enna SJ und Kuhar MJ; *Raven Press*, New York 57 - 90.
- BENNETT MJ, WEINBERGER MJ, KOBORI JA, RINALDO P, BURLINA AB (1996): Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a new defect of fatty acid oxidation. *Pediatr Res* **39**, 185 - 188.
- BERGER AL, WELSH MJ. (2000): Differences between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HisP in the interaction with the adenine ring of ATP. *J Biol Chem* **275**, 29407 - 29412.
- BERMAN HM, WESTBROOK J, FENG Z, GILLILAND G, BHAT TN, WEISSIG H, SHINDYALOV IN, BOURNE PE (2000): The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235 - 242.
- BEYER M, TAWAKKOL W, HECHT HJ, SCHWANSTECHE M (2001): Homology Modeling of the Nukleotide Binding Folds in SURs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363** (Suppl.), R 73: 280.
- BEZANILLA F, ARMSTRONG CM (1977): Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* **70**, 549 - 566.
- BIENENGRAEBER M, ALEKSEEV AE, ABRAHAM MR, CARRASCO AJ, MOREAU C, VIVAUDOU M, DZEJA PP, TERZIC A (2000): ATPase activity of the sulfonylurea receptor: a catalytic function for the KATP channel complex. *FASEB J* **14**, 1943 - 1952.
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**, 1513 - 1523.
- BOVERIE S, ANTOINE MH, DE TULLIO P, SOMERS F, BECKER B, SEBILLE S, LEBRUN P, PIROTE B (2001): Effect on insulin release of compounds structurally related to the potassium-channel opener 7-chloro-3-isopropylamino-4H-1,2,4-benzothiadiazine 1,1-dioxide (BPDZ 73): introduction of heteroatoms on the 3-alkylamino side chain of the benzothiadiazine 1,1-dioxide ring. *J Pharm Pharmacol* **53**, 973 - 980.
- BRUNO JF, XU Y, SONG J, BERELOWITZ M (1992): Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11151 - 11155.
- CAMPBELL JD, SANSOM MS, ASHCROFT FM (2003): Potassium channel regulation. *EMBO Rep* **4**, 1038 - 1042.
- CHANDY KG, GUTMAN GA (1993): Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**, 434.

- CHENG Y, PRUSOFF WH (1973): Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**, 3099 - 3108.
- CHRISTESEN HB, JACOBSEN BB, ODILI S, BUETTGER C, CUESTA-MUNOZ A, HANSEN T, BRUSGAARD K, MASSA O, MAGNUSON MA, SHIOTA C, MATSCHINSKY FM, BARBETTI F (2002): The second activating glucokinase mutation (A456V): implications for glucose homeostasis and diabetes therapy. *Diabetes* **51**, 1240 - 1246.
- CHUTKOW WA, SIMON MC, LE BEAU MM, BURANT CF (1996): Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of SUR2, the putative drug-binding subunit of cardiac, skeletal muscle, and vascular  $K_{ATP}$  channels. *Diabetes* **45**, 1439 - 1445.
- CHUTKOW WA, MAKIELSKI JC, NELSON DJ, BURANT CF, FAN Z (1999): Alternative splicing of sur2 Exon 17 regulates nucleotide sensitivity of the ATP-sensitive potassium channel. *J Biol Chem* **274**, 13656 - 13665.
- CHUTKOW WA, PU J, WHEELER MT, WADA T, MAKIELSKI JC, BURANT CF, McNALLY EM (2002): Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2  $K(ATP)$  channels. *J Clin Invest* **110**, 203 - 208.
- CLAYTON PT, EATON S, AYNLEY-GREEN A, EDGINTON M, HUSSAIN K, KRYWAWYCH S, DATTA V, MALINGRE HE, BERGER R, VAN DEN BERG IE (2001): Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* **108**, 457 - 465.
- CLEMENT JP IV, KUNJILWAR K, GONZALEZ G, SCHWANSTECHE M, PANTEN U, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1997): Association and stoichiometry of  $K_{ATP}$  channel subunits. *Neuron* **18**, 827 - 838.
- COHEN SN, CHANG ACY, HSU L (1972): Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110 - 2114.
- CONTI LR, RADEKE CM, SHYNG SL, VANDENBERG CA (2001): Transmembrane topology of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* **276**, 41270 - 41278.
- COOK DL, SATIN LS, ASHFORD ML, HALES CN (1988): ATP-sensitive  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$ -cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes* **37**, 495 - 498.
- COOK NS, QUAST U (1990): Potassium channel pharmacology. In: *Potassium Channels, Structure, Classification, Function and Therapeutic Potential*. (Cook, NS et al.) Ellis Horwood, Chichester, 181 - 255.
- COSGROVE KE, ANTOINE MH, LEE AT, BARNES PD, DE TULLIO P, CLAYTON P, MCCLOY R, DE LONLAY P, NIHOUL-FEKETE C, ROBERT JJ, SAUDUBRAY JM, RAHIER J, LINDLEY KJ, HUSSAIN K, AYNLEY-GREEN A, PIROTTE B, LEBRUN P, DUNNE MJ (2002): BPDZ 154 activates adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channels: in vitro studies using rodent insulin-secreting cells and islets isolated from patients with hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4860 - 4868.

- CROOP JM (1998): Evolutionary relationships among ABC transporters. *Methods Enzymol* **292**, 101 - 116.
- DAVIS-TABER RA, CHOI W, FENG JL, HOOGENBOOM L, McNALLY T, KROEGER P, SHIEH CC, SIMMER R, BRIONI JD, SULLIVAN JP, GOPALAKRISHNAN M, SCOTT VE (2000): Molecular characterization of human SUR2-containing KATP channels. *Gene* **256**, 261 - 270.
- DEAN PM, MATTHEWS EK (1968): Electrical activity in pancreatic islet cells. *Nature* **219**, 389 - 390.
- DEENEY JT, GROMADA J, HOY M, OLSEN HL, RHODES CJ, PRENTKI M, BERGGREN PO, CORKEY BE (2000): Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *J Biol Chem* **275**, 9363 - 9368.
- DE LONLAY-DEBENEY P, POGGI-TRAVERT F, FOURNET JC, SEMPOUX C, VICI CD, BRUNELLE F, TOUATI G, RAHIER J, JUNIEN C, NIHOUL-FEKETE C, ROBERT JJ, SAUDUBRAY JM (1999): Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism. *N Engl J Med* **340**, 1169 - 1175.
- DE LONLAY P, FOURNET JC, TOUATI G, GROOS MS, MARTIN D, SEVIN C, DELAGNE V, MAYAUD C, CHIGOT V, SEMPOUX C, BRUSSET MC, LABORDE K, BELLANE-CHANTELOT C, VASSAULT A, RAHIER J, JUNIEN C, BRUNELLE F, NIHOUL-FEKETE C, SAUDUBRAY JM, ROBERT JJ (2002): Heterogeneity of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia. A series of 175 cases. *Eur J Pediatr* **161**, 37 - 48.
- DIEDERICHS K, DIEZ J, GRELLER G, MULLER C, BREED J, SCHNELL C, VONRHEIN C, BOOS W, WELTE W (2000): Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose / maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *EMBO J* **19**, 5951 - 5961.
- DOLLERY CT, PENTECOST BL, SAMAN NA (1962): Drug induced diabetes. *Lancet* **ii**, 735 - 737.
- DÖRING F, DERST C, WISCHMEYER E, KARSCHIN C, SCHNEGGENBURGER R, DAUT J, KARSCHIN A (1998): The epithelial inward rectifier channel Kir7.1 displays unusual K<sup>+</sup> permeation properties. *J Neurosci* **18**, 8625 - 8636.
- DÖRSCHNER H, BREKARDIN E, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Stoichiometry of sulfonylurea-induced ATP-sensitive potassium channel closure. *Mol Pharmacol* **55**, 1060 - 1066.
- DÖRSCHNER H (2000): Bedeutung des C-Terminus von Sulfonylharnstoffrezeptoren für die Bindung von Sulfonylharnstoffen und Kalium-Kanal-Öffner. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig
- DOUPNIK CA, DAVIDSON N, LESTER HA (1995): The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* **5**, 268 - 277.
- DRAIN P, LI L, WANG J (1998): K<sub>ATP</sub> channel inhibition by ATP requires distinct functional domains of the cytoplasmic C terminus of the pore-forming subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13953 - 13958.

- DUNNE MJ, COSGROVE KE, SHEPHERD RM, AYNLEY-GREEN A, LINDLEY KJ (2004): Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* **84**, 239 - 275.
- EDWARDS G, WESTON AH (1995): Pharmacology of the potassium channel openers. *Cardiovasc Drugs Ther* **9**, 185 - 193.
- EICHMANN D, HUFNAGEL M, QUICK P, SANTER R (1999): Treatment of hyperinsulinaemic hypoglycaemia with nifedipine. *Eur J Pediatr* **158**, 204 - 206.
- FANG J, HSU BY, MACMULLEN CM, PONCZ M, SMITH TJ, STANLEY CA (2002): Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem J* **363**, 81 - 87.
- FOSSET M, DE WEILLE JR, GREEN RD, SCHMID-ANTOMARCHI H, LAZDUNSKI M (1988): Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **263**, 7933 - 7936.
- FOURNET JC, MAYAUD C, DE LONLAY P, GROSS-MORAND MS, VERKARRE V, CASTANET M, DEVILLERS M, RAHIER J, BRUNELLE F, ROBERT JJ, NIHOUL-FEKETE C, SAUDUBRAY JM, JUNIEN C (2001): Unbalanced expression of 11p15 imprinted genes in focal forms of congenital hyperinsulinism: association with a reduction to homozygosity of a mutation in ABCC8 or KCNJ11. *Am J Pathol* **158**, 2177 - 2184.
- FOURNET JC, JUNIEN C (2003): The Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Horm Res* **59**, suppl 1, 30 - 34.
- GAINES KL, HAMILTON S, BOYD AE III (1988): Characterization of the sulfonylurea receptor on beta-cell membranes. *J Biol Chem* **263**, 2589 - 2592.
- GAUDET R, WILEY DC (2001): Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J* **20**, 4964 - 4972.
- GEISEN K, HITZEL V, OEKOMONOPOULOS R, PÜNTER J, WEYER R, SUMM HD (1985): Inhibition of <sup>3</sup>H-glibenclamide binding to sulfonylurea receptors by oral antidiabetics. *Arzneimittel-Forsch* **35**, 707 - 712.
- GLASER B, KESAVAN P, HEYMAN M, DAVIS E, CUESTA A, BUCHS A, STANLEY CA, THORNTON PS, PERMUTT MA, MATSCHINSKY FM, HEROLD KC (1998): Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med* **338**, 226 - 230.
- GLASER B, LANDAU H, PERMUTT MA (1999): Neonatal Hyperinsulinism. *Trends Endocrinol Metab* **10**, 55 - 61.
- GLASER B, THORNTON P, OTONKOSKI, JUNIEN C (2000): Genetics of neonatal hyperinsulinism. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **82**, F79 - F86.
- GLUZMAN Y (1981): SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175 - 182.

- GOPALAKRISHNAN M, JOHNSON DE, JANIS RA, TRIGGLE DJ (1991): Characterization of binding of the ATP-sensitive potassium channel ligand, [<sup>3</sup>H]glibenclamide, to neuronal and muscle preparations. *J Pharmacol Exp Ther* **257**, 1162 - 1171.
- GOPALAKRISHNAN M, JANIS RA, TRIGGLE DJ (1993): ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels: Pharmacologic properties, regulation and therapeutical potential. *Drug Dev Res* **28**, 95 - 127.
- GRANT DB, DUNGER DB, BURNS EC (1986): Long-term treatment with diazoxide in childhood hyperinsulinism. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* **279**, 340 - 345.
- GRIBBLE FM, TUCKER SJ, ASHCROFT FM (1997): The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K-ATP channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J* **16**, 1145 - 1152.
- GROSS I, TOMAN A, UHDE I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Stoichiometry of potassium channel opener action. *Mol Pharmacol* **56**, 1370 - 1373.
- HENQUIN JC (1987): Regulation of insulin release by ionic and electrical events in  $\beta$ -cells. *Hormone Res* **27**, 168 - 178.
- HIGGINS CF (1992): ABC transporters: From microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**, 67 - 113.
- HIGGINS CF (1995): The ABC of channel regulation. *Cell* **82**, 693 - 696.
- HIGGINS DG, SHARP PM (1988): CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73**, 237 - 244.
- HOLLAND IB, BLIGHT MA (1999): ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**, 381 - 399.
- HOSHI T, ZAGOTTA WN, ALDRICH RW (1990): Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* **250**, 533 - 538.
- HSU WH, XIANG HD, RAJAN AS, KUNZE DL, BOYD AE 3RD (1991): Somatostatin inhibits insulin secretion by a G-protein-mediated decrease in Ca<sup>2+</sup> entry through voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the beta cell. *J Biol Chem* **266**, 837 - 843.
- HUNG LW, WANG IX, NIKAIDO K, LIU PQ, AMES GF, KIM SH (1998): Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**, 703 - 707.
- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, NAMBA N, INAZAWA J, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, SEINO S, BRYAN J (1995a): Reconstitution of IK<sub>ATP</sub>: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* **270**, 166 - 1170.
- INAGAKI N, TSUURA Y, NAMBA N, MASUDA K, GONOI T (1995b): Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem* **270**, 5691 - 5694.



- INAGAKI N, GONOI T, CLEMENT JP IV, WANG CZ, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J, SEINO S (1996): A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *Neuron* **16**, 1011 - 1017.
- ISOMOTO S; KONDO C, YAMADA M, MATSUMOTO S, HIGASHIGUCHI O, HORIO Y, MATSUZAWA Y, KURACHI Y (1996): A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channel. *J Biol Chem* **271**, 24321 - 24324.
- JONES TA (1985): Diffraction methods for biological macromolecules, Interactive computer graphics: FRODO. *Methods Enzymol* **115**, 157 - 171.
- KALHAN SC, SAVIN SM, ADAM PA (1977): Attenuated glucose production rate in newborn infants of insulin-dependent diabetic mothers. *N Engl J Med* **296**, 375 - 376.
- KANE C, LINDLEY KJ, JOHNSON PR, JAMES RF, MILLA PJ, AYNSLEY-GREEN A, DUNNE MJ (1997): Therapy for persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Understanding the responsiveness of beta cells to diazoxide and somatostatin. *J Clin Invest* **100**, 1888 - 1893.
- KARPOWICH N, MARTSINKEVICH O, MILLEN L, YUAN YR, DAI PL, MACVEY K, THOMAS PJ, HUNT JF (2001): Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure* **9**, 571 - 586.
- KAUBISCH N, HAMMER R, WOLLHEIM C, RENOLD AE, OFFORD RE (1982): Specific receptors for sulfonylureas in brain and in B-cell tumor of the rat. *Biochem Pharmacol* **31**, 1171 - 1174.
- KELLY A, POWIS SH, KERR LA, MOCKRIDGE I, ELLIOT T, BASTIN J, UCHANSKA-ZIEGLER B, ZIEGLER A, TROWSDALE J, TOWNSEND A (1992): Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* **355**, 641 - 644.
- KELLY A, STANLEY CA (2001): Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **7**, 287 - 295.
- KHELILI S, DE TULLIO P, LEBRUN P, FILLET M, ANTOINE MH, OUEDRAOGO R, DUPONT L, FONTAINE J, FELEKIDIS A, LECLERC G, DELARGE J, PIROTTE B (1999): Preparation and pharmacological evaluation of the R- and S-enantiomers of 3-(2-butylamino)-4H- and 3-(3-methyl-2-butylamino)-4H-pyrido[4,3-e]-1,2,4-thiadiazine 1,1-dioxide, two tissue selective ATP-sensitive potassium channel openers. *Bioorg Med Chem* **7**, 1513 - 1520.
- KOSTER JC, MARSHALL BA, ENSOR N, CORBETT JA, NICHOLS CG (2000): Targeted overactivity of  $\beta$  cell K<sub>ATP</sub> channels induces profound neonatal diabetes. *Cell* **100**, 645 - 54.
- KOVACS RJ, NELSON MT (1991): ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels from aortic smooth muscle incorporated into planar lipid bilayers. *Am J Physiol* **261**, H604 - H609.
- KRAULIS PJ (1991): MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J App Cryst* **24**, 946 - 950.

- LIDLAW GF (1938): Nesidioblastoma, the islet tumor of the pancreas. *Am J Path* **14**, 125 - 134.
- LAMERS MH, PERRAKIS A, ENZLIN JH, WINTERWERP HH, DE WIND N, SIXMA TK (2000): The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch. *Nature* **407**, 711 - 716.
- LAWSON K (1996): Potassium channel activation: a potential therapeutic approach? *Pharmacol Ther* **70**, 39 - 63.
- LAWSON K, DUNNE MJ (2001): Peripheral channelopathies as targets for potassium channel openers. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 1345 - 1359.
- LEIBOWITZ G, GLASER B, HIGAZI AA, SALAMEH M, CERASI E, LANDAU H (1995): Hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy (nesidioblastosis) in clinical remission: high incidence of diabetes mellitus and persistent beta-cell dysfunction at long-term follow-up. *Clin Endocrinol Metab* **80**, 386 - 392.
- LEVIN SR, CHARLES MA, O'CONNOR M, GRODSKY GM (1975): Use of diphenylhydantoin and diazoxide to investigate insulin secretory mechanisms. *Am J Physiol* **229**, 49 - 54.
- LINDLEY KJ, DUNNE MJ, KANE C, SHEPHERD RM, SQUIRES PE, JAMES RF, JOHNSON PR, ECKHARDT S, WAKELING E, DATTANI M, MILLA PJ, AYNLEY-GREEN A (1996): Ionic control of beta cell function in nesidioblastosis. A possible therapeutic role for calcium channel blockade. *Arch Dis Child* **74**, 373 - 378.
- LOO TW, CLARKE DM (2000): Identification of residues within the drug-binding domain of the human multidrug resistance P-glycoprotein by cysteine-scanning mutagenesis and reaction with dibromobimane. *J Biol Chem* **275**, 39272 - 39278.
- LOPATA MA, CLEVELAND DW, SOLLNER-WEBB B (1984): High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* **12**, 5707 - 5717.
- LUTHMAN H, MAGNUSSON G (1983): High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells. *Nucleic Acids Res* **11**, 1295 - 1308.
- MACKINNON R (1995): Pore loops: an emerging theme in ion channel structure. *Neuron* **14**, 889 - 892.
- MACMULLEN C, FANG J, HSU BY, KELLY A, DE LONLAY-DEBENEY P, SAUDUBRAY JM, GANGULY A, SMITH TJ, STANLEY CA; HYPERINSULINISM/HYPERAMMONEMIA CONTRIBUTING INVESTIGATORS (2001): Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate-binding domain of glutamate dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1782 - 1787.
- MALM D, GIAEVER A, VONEN B, FLORHOLMEN J (1993): Cholecystokinin and somatostatin modulate the glucose-induced insulin secretion by different mechanisms in pancreatic islets. A study on phospholipase C activity and calcium requirement. *Scand J Clin Lab Invest* **53**, 671 - 676.

- MATSUO M, TUCKER SJ, ASHCROFT FM, AMACHI T, UEDA K (1999): NEM modification prevents high-affinity ATP binding to the first nucleotide binding fold of the sulphonylurea receptor, SUR1. *FEBS Lett* **458**, 292 - 294.
- MATSUO M, DABROWSKI M, UEDA K, ASHCROFT FM (2002): Mutations in the linker domain of NBD2 of SUR inhibit transduction but not nucleotide binding. *EMBO J* **21**, 4250 - 4258.
- MATTHEWS EK (1985): Electrophysiology of pancreatic islet  $\beta$ -cells. In: The Electrophysiology of the Secretory Cell; hrsg. von POISNER AM, TRIFARO JM; Elsevier, Amsterdam, 93 - 112.
- MENNI F, DE LONLAY P, SEVIN C, TOUATI G, PEIGNE C, BARBIER V, NIHOUL-FEKETE C, SAUDUBRAY JM, ROBERT JJ (2001): Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatrics* **107**, 476 - 479.
- MEISSNER T, BRUNE W, MAYATEPEK E (1997): Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: therapy, clinical outcome and mutational analysis. *Eur J Pediatr* **156**, 754 - 757.
- MEISSNER T, OTONKOSKI T, FENEBERG R, BEINBRECH B, APOSTOLIDOU S, SIPILA I, SCHAEFER F, MAYATEPEK E (2001): Exercise induced hypoglycaemic hyperinsulinism. *Arch Dis Child* **84**, 254 - 257.
- MIMMACK ML, GALLAGHER MP, PEARCE SR, HYDE SC, BOOTH IR, HIGGINS CF (1989): Energy coupling to periplasmic binding protein-dependent transport systems: Stoichiometry of ATP hydrolysis during transport in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 8257 - 8261.
- MIMURA CS, HOLBROOK SR, AMES GF (1991): Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 84 - 88.
- MISLER S, BARNETT DW, GILLIS KD, PRESSEL DM (1992): Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human  $\beta$ -cells. *Diabetes* **41**, 1221 - 1228.
- MULLIS KB, FALOONA FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335 - 350.
- NESTOROWICZ A, WILSON BA, SCHOOR KP, INOUE H, GLASER B, LANDAU H, STANLEY CA, THORNTON PS, CLEMENT JP 4TH, BRYAN J, AGUILAR-BRYAN L, PERMUTT MA (1996): Mutations in the sulphonylurea receptor gene are associated with familial hyperinsulinism in Ashkenazi Jews. *Hum Mol Genet* **5**, 1813 - 1822.
- NESTOROWICZ A, GLASER B, WILSON BA, SHYNG SL, NICHOLS CG, STANLEY CA, THORNTON PS, PERMUTT MA (1998): Genetic heterogeneity in familial hyperinsulinism. *Hum Mol Genet* **7**, 1119 - 1128.
- NICHOLS CG, SHYNG SL, NESTOROWICZ A, GLASER B, CLEMENT JP 4TH, GONZALEZ G, AGUILAR-BRYAN L, PERMUTT MA, BRYAN J (1996): Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* **272**, 1785 - 1787.

- NICHOLS CG, LOPATIN AN (1997): Inward rectifier potassium channels. *Annu Rev Physiol* **59**, 171 - 191.
- NILSSON T, ARKHAMMAR P, RORSMAN P, BERGGREN PO (1989): Suppression of insulin release by galanin and somatostatin is mediated by a G-protein. An effect involving repolarization and reduction in cytoplasmic free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. *J Biol Chem* **264**, 973 - 980.
- NISHIMURA A, MORITA M, NISHIMURA Y, SUGINO Y (1990): A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res* **18**, 6169.
- OKUYAMA Y, YAMADA M, KONDO C, SATOH E, ISOMOTO S, SHINDO T, HORIO Y, KITAKAZE M, HORI M, KURACHI Y (1998): The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex  $\text{K}^{+}$ -channel expressed in mammalian cell line, HEK293T. *Pflügers Arch* **435**, 595 - 603.
- OTONKOSKI T, AMMALA C, HUOPIO H, COTE GJ, CHAPMAN J, COSGROVE K, ASHFIELD R, HUANG E, KOMULAINEN J, ASHCROFT FM, DUNNE MJ, KERE J, THOMAS PM (1999): A point mutation inactivating the sulfonylurea receptor causes the severe form of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy in Finland. *Diabetes* **48**, 408 - 415.
- OTONKOSKI T, KAMINEN N, USTINOV J, LAPATTO R, MEISSNER T, MAYATEPEK E, KERE J, SIPILA I (2003): Physical exercise-induced hyperinsulinemic hypoglycemia is an autosomal-dominant trait characterized by abnormal pyruvate-induced insulin release. *Diabetes* **52**, 199 - 204.
- PATEL YC, GREENWOOD MT, WARSZYNSKA A, PANETTA R, SRIKANT CB (1994): All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 605 - 612.
- PEARSON WR, LIPMAN DJ (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 2444 - 2448.
- PHEIFFER BH, ZIMMERMANN SB (1983): Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res* **11**, 7853 - 3871.
- PILKIS SJ, WEBER IT, HARRISON RW, BELL GI (1994): Glucokinase: structural analysis of a protein involved in susceptibility to diabetes. *J Biol Chem* **269**, 21925 - 21928.
- PRENTKI M, TORNHEIM K, CORKEY BE (1997): Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia* **40** (Suppl 2), S32 - 41.
- QUAST U, COOK NS (1989): Moving together:  $\text{K}^{+}$ -channel openers and ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$ -channels. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 431 - 435.
- RAAB-GRAHAM KF, CIRILO LJ, BOETTCHER AA, RADEKE CM, VANDENBERG CA (1999): Membrane topology of the amino-terminal region of the sulfonylurea receptor. *J Biol Chem* **274**, 29122 - 29129.

- RAMADAN DG, BADAWI MH, ZAKI M, EL MAZIDI Z, ISMAIL EA, EL ANZI H (1999): Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy (nesidioblastosis): a report from Kuwait. *Ann Trop Paediatr* **19**, 55 - 59.
- REIMANN F, HUOPIO H, DABROWSKI M, PROKS P, GRIBBLE FM, LAAKSO M, OTONKOSKI T, ASHCROFT FM (2003): Characterisation of new K(ATP)-channel mutations associated with congenital hyperinsulinism in the Finnish population. *Diabetologia* **46**, 241 - 249.
- REPKE H, LIEBMANN C (1987): Membranrezeptoren und ihre Effektorsysteme. *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim*.
- RIBALET B, EDDLESTONE GT (1995): Characterization of the G protein coupling of SRIF and beta-adrenergic receptors to the maxi KCa channel in insulin-secreting cells. *Membr Biol* **148**, 111 - 125.
- RYCHLIK W, SPENCER WJ, RHOADS RE (1990): Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res* **18**, 6409 - 6412.
- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487 - 491.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): Molecular cloning, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, USA*.
- SARASTE M, SIBBALD PR, WITTINGHOFFER A (1990): The P-loop – A common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430 - 434.
- SAUNA ZE, AMBUDKAR SV (2001): Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem* **276**, 11653 - 11661.
- SAVEANU L, DANIEL S, VAN ENDERT PM (2001): Distinct functions of the ATP binding cassettes of transporters associated with antigen processing: a mutational analysis of Walker A and B sequences. *J Biol Chem* **276**, 22107 - 22113.
- SCHMID-ANTOMARCHI H, DE WEILLE J, FOSSET M, LAZDUNSKI M (1987): The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K<sup>+</sup>-channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* **262**, 15840 - 15844.
- SCHNEIDER E (2000): ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer Verbindungen über biologische Membranen. *Chem. unserer Zeit* **2**, 90 - 98.
- SCHOMBURG D, REICHELT J (1988): Bragi: A comprehensive protein modeling program system. *J Mol Graph* **6**, 161 - 165.
- SCHWANSTECHER M, RIETZE I (1990): Hydrolyzable nucleotides inhibit glibenclamide binding in pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **341** (Suppl), R72.

- SCHWANSTECHE M, BEHREND S, PANTEN U (1991a): The  $Mg^{2+}$ -complex of ATP regulates the affinity of the solubilized sulfonylurea receptor from HIT-cells. *Diabetologia* **34** (Suppl. 2), A63.
- SCHWANSTECHE M, LÖSER S, RIETZE I, PANTEN U (1991b): Phosphate and thiophosphate group donating adenine and guanine nucleotides inhibit glibenclamide binding to membranes from pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **343**, 83 - 89.
- SCHWANSTECHE C, DICKEL C, EBERS I, LINS S, ZÜNKLER BJ, PANTEN U (1992a): Diazoxide-sensitivity of the adenosine 5'-triphosphate-dependent  $K^+$  channel in mouse pancreatic beta-cells. *Br J Pharmacol* **107**, 87 - 94.
- SCHWANSTECHE M, BEHREND S, BRANDT C, PANTEN U (1992b): The binding properties of the solubilized sulfonylurea receptor from a pancreatic B-cell line are modulated by the  $Mg^{++}$ -complex of ATP. *J Pharmacol Exp Ther* **262**, 495 - 502.
- SCHWANSTECHE M, BRANDT C, BEHREND S, SCHAUPP U, PANTEN U (1992c): Effects of  $MgATP$  on Pinacidil-induced displacement of glibenclamide from the sulphonylurea receptor in a pancreatic  $\beta$ -cell line and rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* **106**, 295 - 301.
- SCHWANSTECHE M, SCHAUPP U, LÖSER S, PANTEN U (1992d): The binding properties of the particulate and solubilized sulfonylurea receptor from cerebral cortex are modulated by the  $Mg^{2+}$ -complex of ATP. *J Neurochem* **59**, 1325 - 1335.
- SCHWANSTECHE M (1994): Charakterisierung des Sulfonylharnstoffrezeptors in insulin-sezierenden Zellen und cerebralem Cortex. *Habilitation*, Universität Göttingen.
- SCHWANSTECHE M, SCHWANSTECHE C, DICKEL C, CHUDZIAK F, MOSHIRI A, PANTEN U (1994): Location of the sulphonylurea receptor at the cytoplasmic face of the beta-cell membrane. *Br J Pharmacol* **113**, 903 - 911.
- SCHWANSTECHE C, BASSEN D (1997):  $K_{ATP}$ -channel on the somata of spiny neurons in rat caudate nucleus: regulation by drugs and nucleotides. *Br J Pharmacol* **121**, 193 - 198.
- SCHWANSTECHE M, SIEVERDING C, DÖRSCHNER H, GROSS I, AGUILAR-BRYAN L, SCHWANSTECHE C, BRYAN J (1998): Potassium channel openers require ATP to bind to and act through sulfonylurea receptors. *EMBO J* **17**, 5529 - 5534.
- SEINO S, IWANAGA T, NAGASHIMA K, MIKI T (2000): Diverse roles of  $K(ATP)$  channels learned from Kir6.2 genetically engineered mice. *Diabetes* **49**, 311 - 318.
- SEINO S (2003): Physiology and pathophysiology of  $K(ATP)$  channels in the pancreas and cardiovascular system: a review. *J Diabetes Complications* **17** (2 Suppl.), 2 - 5.
- SENIOR AE, GADSBY DC (1997): ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR. *Semin Cancer Biol* **8**, 143 - 150.

- SERVICE FJ, NATT N, THOMPSON GB, GRANT CS, VAN HEERDEN JA, ANDREWS JC, LORENZ E, TERZIC A, LLOYD RV (1999): Noninsulinoma pancreatogenous hypoglycemia: a novel syndrome of hyperinsulinemic hypoglycemia in adults independent of mutations in Kir6.2 and SUR1 genes. *J Clin Endocrinol Metab* **84**, 1582 - 1589.
- SHANBAG P, PATHAK A, VAIDYA M, SHAHID SK (2002): Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy - successful therapy with nifedipine. *Indian J Pediatr* **69**, 271 - 272.
- SHANKARAPPA B, SIRKO DA, EHRLICH GD (1992a): A general method for the identification of regions suitable for site-directed silent mutagenesis. *Biotechniques* **12**, 382 - 384.
- SHANKARAPPA B, VIJAYANANDA K, EHRLICH GD (1992b): SILMUT: a computer program for the identification of regions suitable for silent mutagenesis to introduce restriction enzyme recognition sequences. *Biotechniques* **12**, 882 - 884.
- SHARMA N, CRANE A, CLEMENT JP 4TH, GONZALEZ G, BABENKO AP, BRYAN J, AGUILAR-BRYAN L (1999): The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. *J Biol Chem* **274**, 20628 - 20632.
- SHARMA N, CRANE A, GONZALEZ G, BRYAN J, AGUILAR-BRYAN L (2000): Familial hyperinsulinism and pancreatic  $\beta$ -cell ATP-sensitive potassium channels. *Kidney International* **57**, 803 - 808.
- SHEPHERD RM, COSGROVE KE, O'BRIEN RE, BARNES PD, AMMALA C, DUNNE MJ (2000): Hyperinsulinism of infancy: towards an understanding of unregulated insulin release. European Network for Research into Hyperinsulinism in Infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **82**, F 87 - 97.
- SHILYANSKY J, FISHER S, CUTZ E, PERLMAN K, FILLER RM (1997): Is 95% pancreatectomy the procedure of choice for treatment of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the neonate? *J Pediatr Surg* **32**, 342 - 346.
- SHYAMALA V, BAICHWAL V, BEALL E, AMES GF (1991): Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* **266**, 18714 - 18719.
- SHYNG SL, FERRIGNI T, NICHOLS CG (1997): Control of rectification and gating of cloned K<sub>ATP</sub> channels by the Kir6.2 subunit. *J Gen Physiol* **110**, 141 - 153.
- SIEVERDING A (1998a): Regulation der hochaffinen Bindung von Sulfonylharnstoffen an SUR1 durch Nucleotide und Nucleotidanaloge. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- SIEVERDING C (1998b): Identifikation und Charakterisierung der Bindungsstelle für Kalium-Kanal-Öffner auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- SMITH PA, SELLERS LA, HUMPHREY PP (2001): Somatostatin activates two types of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels in MIN-6 cells. *J Physiol* **532**, 127 - 142.

- STANDEN NB, QUAYLE JM, DAVIES NW, BRAYDEN JE, HUANG Y, NELSON (1989): Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science* **245**, 177 - 180.
- STANLEY CA, LIEU YK, HSU BY, BURLINA AB, GREENBERG CR, HOPWOOD NJ, PERLMAN K, RICH BH, ZAMMARCHI E, PONCZ M (1998): Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* **338**, 1352 - 1357.
- STANLEY CA (2002): Advances in diagnosis and treatment of Hyperinsulinism in Infants and Children. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4857 - 4859.
- STRAUB SG, COSGROVE KE, AMMALA C, SHEPHERD RM, O'BRIEN RE, BARNES PD, KUCHINSKI N, CHAPMAN JC, SCHAEPI M, GLASER B, LINDLEY KJ, SHARP GW, AYNLEY-GREEN A, DUNNE MJ (2001): Hyperinsulinism of infancy: the regulated release of insulin by KATP channel-independent pathways. *Diabetes* **50**, 329 - 39.
- STURGESS NC, ASHFORD MLJ, COOK DL, HALES CN (1985): The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *Lancet* **2**, 474 - 475.
- TANG X, NAKATA Y, LI HO, ZHANG M, GAO H, FUJITA A, SAKATSUME O, OHTA T, YOKOYAMA K (1994): The optimization of preparations of competent cells for transformation of E. coli. *Nucleic Acids Res* **22**, 2857 - 2858.
- TAWAKKOL W (2001): Functional characterization of PHHI-inducing mutations in SUR1. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- THOMAS PM, COTE GJ, WOHLK N, HADDAD B, MATHEW PM, RABL W, AGUILAR-BRYANL, GAGEL RF, BRYAN J (1995): Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* **268**, 426 - 429.
- THOMAS PM, WOHLK N, HUANG E, KUHNLE U, RABL W, GAGEL RF, COTE GJ (1996): Inactivation of the first nucleotide-binding fold of the sulfonylurea receptor, and familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Am J Hum Genet* **59**, 510 - 518.
- THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876 - 4882.
- TOMAN A (2001): Lokalisation der Bindungsstelle für Sulfonylharnstoffe auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- TOUATI G, POGGI-TRAVERT F, OGIER DE BAULNY H, RAHIER J, BRUNELLE F, NIHOUL-FEKETE C, CZERNICHOW P, SAUDUBRAY JM (1998): Long-term treatment of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy with diazoxide: a retrospective review of 77 cases and analysis of efficacy-predicting criteria. *Eur J Pediatr* **157**, 628 - 633.
- TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K<sup>+</sup>-channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* **407**, 493 - 499.



- TUCKER SJ, GRIBBLE FM, ZHAO C, TRAPP S, ASHCROFT FM (1997): Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* **387**, 179 - 183.
- TUSNADY GE, BAKOS E, VARADI A, SARKADI B (1997): Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Lett* **402**, 1 - 3.
- TYRRELL VJ, AMBLER GR, YEOW WH, COWELL CT, SILINK M.J (2001): Ten years' experience of persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy. *Paediatr Child Health* **37**, 483 - 488.
- UEDA K, INAGAKI N, SEINO S (1997): MgADP antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J Biol Chem* **272**, 22983 - 22986.
- UEDA K, KOMINE J, MATSUO M, SEINO S, AMACHI T (1999): Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulfonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1268 - 1272.
- UHDE I, TOMAN A, GROSS I, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1999): Identification of the potassium channel opener site on sulfonylurea receptors. *J Biol Chem* **274**, 28079 - 28082.
- UHDE I (2001): Lokalisation der Bindungsstelle für Kalium-Kanal-Öffner auf Sulfonylharnstoffrezeptoren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- ULLRICH S, PRENTKI M, WOLLHEIM CB (1990): Somatostatin inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced insulin secretion in permeabilized HIT-T15 cells. *Biochem J* **270**, 273 - 276.
- VELHO G, BLANCHE H, VAXILLAIRE M, BELLANNE-CHANTELOT C, PARDINI VC, TIMSIT J, PASSA P, DESCHAMPS I, ROBERT JJ, WEBER IT, MAROTTA D, PILKIS SJ, LIPKIND GM, BELL GI, FROGUEL P (1997): Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia* **40**, 217 - 224.
- VOGELSTEIN B, GILLESPIE D (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 615 - 619.
- VOS JC, SPEE P, MOMBURG F, NEEFJES J (1999) : Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol* **163**, 6679 - 6685.
- WALKER JE, SARASTE M, RUNSWICK MJ, GAY NJ (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945 - 951.
- WALLENSTEIN S, ZUCKER CL, FLEISS JL (1980): Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* **47**, 1 - 9.
- WITTINGHOFFER A, PAI EF (1991): The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* **16**, 382 - 194.

- YAMADA M, ISOMOTO S, MATSUMOTO S, KONDO C, SHINDO T, HORIO Y, KURACHI Y (1997): Sulfonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol* **499**, 715 - 720.
- YOUNG J, HOLLAND IB (1999): ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim Biophys Acta* **1461**, 177 - 200.
- YUAN YR, BLECKER S, MARTSINKEVICH O, MILLEN L, THOMAS PJ, HUNT JF (2001): The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem* **276**, 32313 - 32321.
- ZAGOTTA WN, HOSHI T, ALDRICH RW (1990): Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science* **250**, 568 - 571.
- ZERANGUE N, SCHWAPPACH B, JAN YN, JAN LY (1999): A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**, 537 - 548.
- ZINGMAN LV, ALEKSEEV AE, BIENENGRAEBER M, HODGSON D, KARGER AB, DZEJA PP, TERZIC A (2001): Signaling in channel/enzyme multimers: ATPase transitions in SUR module gate ATP-sensitive K<sup>+</sup> conductance. *Neuron* **31**, 233 - 245.
- ZINGMAN LV, HODGSON DM, BIENENGRAEBER M, KARGER AB, KATHMANN EC, ALEKSEEV AE, TERZIC A (2002): Tandem function of nucleotide binding domains confers competence to sulfonylurea receptor in gating ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* **277**, 14206 - 14210.
- ZINI S, BEN-ARI Y, ASHFORD MLJ (1991): Characterization of sulfonylurea receptors and the action of potassium channel openers on cholinergic neurotransmission in guinea pig isolated small intestine. *J Pharmacol Exper Ther* **259**, 566 - 573.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Geboren am	01.01.1974
in	Ulm / Donau
Eltern	Werner Rudolf Beyer Gabriele Maria Beyer geb. Pfeiffer
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### **Schule**

1980 - 1984	Grundschule in Neu-Ulm
1984 - 1993	Lessing-Gymnasium in Neu-Ulm
Juli 1993	Allgemeine Hochschulreife

### **Wehrdienst**

Okt. 1993 - Sept. 1994	Grundwehrdienst und Ausbildung zum Sanitätssoldaten in Würzburg, Fürstenfeldbruck und Leipheim
------------------------	---

### **Ausbildung**

Okt. 1994 - Sept. 1999	Pharmaziestudium an der TU Braunschweig
Aug. 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 1999 - Dez. 1999	Praktikum in der Hagenmarkt-Apotheke, Braunschweig
Jan. 2000 - Juni 2000	Praktikum bei Schaper&Brümmer, Salzgitter / Ringelheim
Juli 2000	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Juli 2000	Approbation als Apotheker

### **Berufstätigkeit**

seit Aug. 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der TU Braunschweig
seit Juni 2001	Apotheker in der Punkt-Apotheke, Salzgitter / Bad